

**angefertigt am Forschungszentrum Borstel**  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Programmbereich Asthma und Allergie  
Forschungsgruppe Angeborene Immunität  
Leiter: PD Dr. Holger Heine

**Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**  
Zoologisches Institut  
Abteilung für Zoophysiology  
Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie/Vergleichende Immunbiologie  
Leiter: Prof. Dr. Thomas Roeder

**Charakterisierung des Transkriptionsfaktors FoxO  
als zentraler Stressmediator und Effektor einer  
stressinduzierten Immunantwort  
im respiratorischen Epithel der Taufliede  
*Drosophila melanogaster***

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Karin Uliczka**

Kiel, 2012

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter:

PD. Dr. Holger Heine

Tag der mündlichen Prüfung:

08.02.2013

Zum Druck genehmigt:

08.02.2013

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Drosophila</i> als Modellorganismus.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Experimentelle Möglichkeiten im Modell <i>Drosophila</i> .....	3
1.2.2 Das respiratorische System der Fliege ist das funktionelle Analogon der menschlichen Lunge.....	5
<b>1.3 Das Immunsystem von <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden und Antimikrobielle Peptide .....	8
1.3.2 JNK- und Jak/STAT-Signalwege.....	10
<b>1.4 Zelluläre Stressantwort von <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 ROS, oxidativer Stress und das Immunsystem .....	13
1.4.2 Keap1-Nrf2-Signalweg.....	14
1.4.3 Insulin/IGF-Signalweg.....	16
<b>1.5 Forkhead Box-Transkriptionsfaktoren .....</b>	<b>18</b>
1.5.1 FoxO - Forkhead Box-Transkriptionsfaktor der Klasse O .....	18
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Technische Geräte .....	22
3.1.2 Programme, Datenbanken und bioinformatische Hilfsmittel .....	23
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	23
3.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Inhibitoren und Kits .....	24
<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	24
<i>Enzyme und Inhibitoren</i> .....	25
<i>Kits</i> .....	25
3.1.5 Puffer, Stammlösungen und Medien .....	25
<i>Puffer und Stammlösungen</i> .....	25
<i>Standardmedium zur Kultivierung von <i>Drosophila melanogaster</i></i> .....	25

	<i>Medium zur Kultivierung von A549-Zellen</i> .....	26
3.1.6	Antikörper.....	26
	<i>Primärantikörper</i> .....	26
	<i>Sekundärantikörper</i> .....	26
3.1.7	Oligonukleotide.....	26
3.1.8	<i>Drosophila</i> -Stämme.....	28
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Umgang mit dem Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
	<i>Kulturführung von Drosophila melanogaster</i> .....	29
	<i>Kreuzungen</i> .....	30
	<i>Stressversuche an Drosophila melanogaster</i> .....	30
	<i>Präparation von Tracheen und Fettkörpern</i> .....	31
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	31
	<i>Kulturführung von humanen Zelllinien</i> .....	31
	<i>Stressversuche an humanen A549-Zellen</i> .....	32
3.2.3	Mikroskopische Methoden.....	32
3.2.3.1	Mikroskopieren von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
	<i>GFP-Reporter</i> .....	33
	<i>lacZ/β-Galaktosidase-Reporter</i> .....	34
3.2.3.2	Mikroskopieren von humanen A549-Zellen.....	35
3.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	36
	<i>DNA-Isolierung</i> .....	36
	<i>RNA-Isolierung</i> .....	36
	<i>cDNA-Synthese</i> .....	36
3.2.4.2	<i>real-time PCR</i> .....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Relevanz des Transkriptionsfaktors FoxO für die Entwicklung und Morphologie der larvalen Tracheen von <i>Drosophila</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Regulierung der FoxO-Aktivität durch Stress</b> .....	<b>42</b>
4.2.1	Stressinduzierte FoxO-Aktivierung im respiratorischen Epithel von <i>Drosophila</i> -Larven.....	42
4.2.2	Stressinduzierte FoxO-Aktivierung in humanen alveolären Epithelzellen.....	48
<b>4.3</b>	<b>Stress induziert die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>58</b>

<b>4.4 Hunger induziert eine NF-<math>\kappa</math>B-unabhängige AMP-Expression vermittelt durch den Transkriptionsfaktor FoxO und die Insulin/IGF-Signalkaskade..</b>	<b>61</b>
4.4.1 Die durch Hunger induzierte AMP-Regulation erfolgt unabhängig von den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Relish und Dorsal .....	61
4.4.2 Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene ist ein FoxO-abhängiger Prozess.....	64
4.4.3 Der Insulin/IGF-Signalweg als Kandidat für die Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene.....	66
<b>4.5 Oxidativer Stress induziert eine NF-<math>\kappa</math>B-unabhängige AMP-Expression .....</b>	<b>67</b>
4.5.1 Die durch oxidativen Stress induzierte Expression von Antimikrobiellen Peptid-Genen ist ein FoxO-unabhängiger aber FoxO-regulierter Prozess .....	68
<b>4.6 Identifikation der durch oxidativen Stress initialisierten zellulären Prozesse in der <i>Drosophila</i>-Larve .....</b>	<b>70</b>
4.6.1 Oxidativer Stress induziert eine <i>drosomycin</i> -Expression im Fettkörper, Mitteldarm und in Perikardialen Zellen der <i>Drosophila</i> -Larve .....	70
4.6.2 Oxidativer Stress induziert die Expression einiger ROS-protectiver Gene .....	72
4.6.3 Oxidativer Stress aktiviert den JNK-Signalweg .....	74
4.6.4 Oxidativer Stress aktiviert den Jak/STAT-Signalweg .....	77
4.6.5 Oxidativer Stress aktiviert den Keap1-Nrf2-Signalweg.....	79
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxO für die Entwicklung und Morphologie der larvalen Atemorgane.....</b>	<b>81</b>
5.1.1 Induzierte FoxO-Expression in larvalen Tracheen .....	81
5.1.2 Die Auswirkung von FoxO-Defizienz.....	83
<b>5.2 FoxO - ein evolutionär konservierter Stressmediator.....</b>	<b>84</b>
5.2.1 FoxO - ein universeller Stressmediator im respiratorischen Epithel der <i>Drosophila</i> -Larve .....	85
5.2.2 Humane FoxOs - Stressmediatoren mit variierender Spezifität in respiratorischen Epithelzellen .....	86
<b>5.3 Stress induziert eine AMP-Expression in <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4 FoxO - ein Bindeglied zwischen Metabolismus und Immunantwort .....</b>	<b>91</b>
<b>5.5 Oxidativer Stress induziert AMP-Expression in einem FoxO-unabhängigen Prozess .....</b>	<b>93</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>100</b>

<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>112</b>
<b>8 Summary.....</b>	<b>114</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>10 Curriculum Vitae .....</b>	<b>116</b>
<b>11 Erklärung .....</b>	<b>118</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielles Peptid
AP-1	<i>activating protein 1</i>
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATG	<i>autophagy-related gene</i>
bp	Basenpaar
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
Cnc	Cap-n-collar
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
dFADD	<i>Drosophila fas-associated death domain</i>
DIF	<i>dorsal-related immunity factor</i>
dILP	<i>Drosophila insulin-like peptide</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DREDD	<i>death-related ced-3/nedd2-like protein</i>
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii/et altera</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
<i>g</i>	<i>gravity</i> (Gravitation)
GADD45	<i>growth arrest DNA damage 45</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GNBP	<i>Gram-negative binding protein</i>
gstD	Glutathion-S-Transferase D



h	hour/Stunde(n)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
IKK	I $\kappa$ B-Kinase Komplex
ILS	Insulin/IGF-Signalweg
IMD	<i>immune deficiency</i>
InR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor Substrat
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KEAP1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	MAP Kinase
min	Minute(n)
MKK	MAP Kinase Kinase
MKP	MAPK Phosphatase
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i>
MST1	<i>mammalian ste20-like kinase 1</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor of kappa light chain enhancer in B-cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDK1	<i>phosphatidylinositol-dependent kinase 1</i>

PGN	Peptidoglykan
PGRP	<i>peptidoglycan recognition protein</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositol-Phosphat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
REL	<i>reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffverbindungen)
<i>rpl13</i>	<i>60S ribosomal protein L13</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur ( $\approx 21^{\circ}\text{C}$ )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SPE	Spätzle-prozessierendes Enzym
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TARGET	<i>temporal and regional gene expression targeting</i>
TAK1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
TEP	<i>thioester-containing proteins</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethylamin
U	<i>Units</i> /Einheiten
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
UPD	<i>unpaired</i>
USP7	<i>ubiquitin-specific processing protease 7</i>
wt	Wildtyp

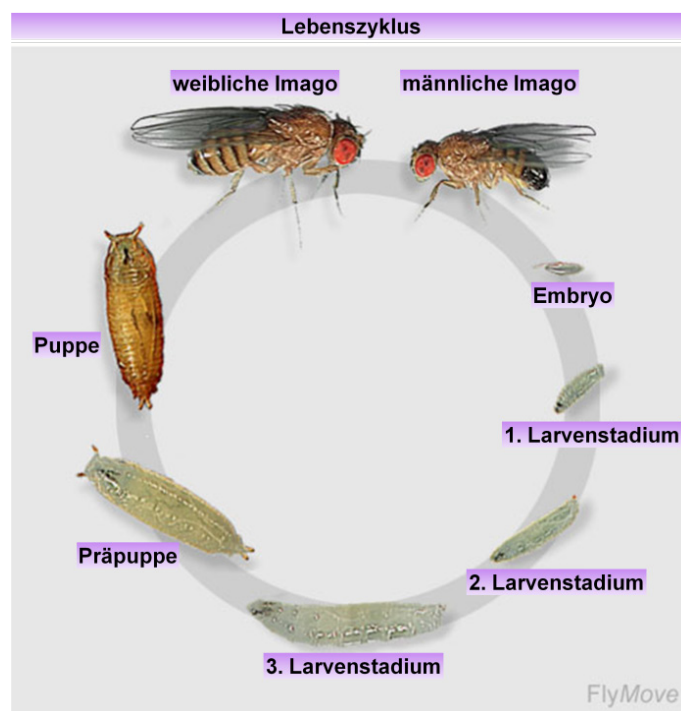
% (v/v)	<i>percent volume per volume</i>
% (w/v)	<i>percent weight per volume</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Drosophila melanogaster*

Die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* ist ein nur etwa 2,5 mm großes, zweiflügeliges Insekt, das erstmals 1890 von Johann Wilhelm Meigen beschrieben wurde und zusammen mit 700 weiteren Arten zur Familie der Taufliegen gehört.

Als holometaboles Insekt unterscheidet sich die Morphologie der Taufliege im Larvenstadium völlig von der des geschlechtsreifen Vollinsektes. Der Übergang zwischen diesen beiden Erscheinungsformen vollzieht sich in einem mehrere Tage dauernden Puppenstadium, währenddessen das Insekt eine vollständige Metamorphose durchläuft.



**Abb. 1.1: Der Lebenszyklus der Taufliege *Drosophila melanogaster***

Der Lebenszyklus der Taufliege dauert etwa zehn Tage und ist ein typisches Beispiel für die Entwicklung holometaboler Insekten mit einem Larvenstadium, einer vollständigen Metamorphose innerhalb einer sessilen Puppe und einem geschlechtsreifen Vollinsekt, der Imago. (verändert nach <http://flymove.uni-muenster.de>)

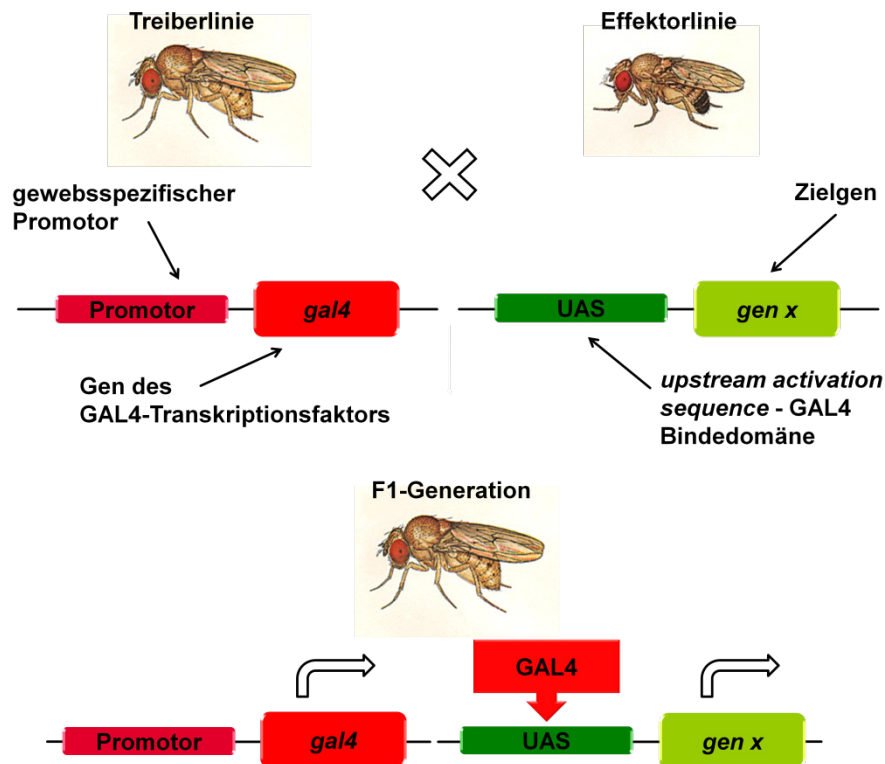
Der gesamte Generationszyklus der Taufliege (Abb. 1.1), der stark von der Umgebungstemperatur abhängig ist, hat eine Dauer von zehn bis zwölf Tagen. Nur 24 Stunden nach der Eiablage hat sich der Embryo zu einer apoden Larve entwickelt, die in der Folge an Größe zunimmt, wobei drei Larvenstadien (L1-L3) unterschieden werden. Im letzten Stadium verlässt die Larve ihren Lebensraum, wird sessil und verliert ihre

Bewegungsfähigkeit. Zunächst entsteht eine Präpuppe und schließlich eine Puppe, in der die Ent- und Neudifferenzierung der Organe stattfindet. Die letzte Häutung eines holometabolen Insekts ist dem Schlupf der Imago aus der Puppenhaut gleichzusetzen. Adulte Taufliegen haben eine Lebenserwartung von zwei bis drei Monaten. Die kurze Generationszeit, die einfache Haltung, sowie die ganzjährige Reproduktion sind einige der Gründe weshalb *Drosophila melanogaster* im Laufe des letzten Jahrhunderts zu einem der bedeutendsten Modellorganismen der naturwissenschaftlichen Forschung geworden ist.

## 1.2 *Drosophila* als Modellorganismus

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannten William Ernest Castle und kurz darauf Thomas Hunt Morgan das Potential und die zahlreichen Vorteile, die *Drosophila* mit sich brachte und führten sie als Modellorganismus in die Biologie ein. Zunächst zum Zwecke der Erforschung grundlegender Begriffe der Genetik verwendet, diente die Fliege später als bevorzugtes Forschungsobjekt der Embryonalentwicklung. Heute existiert kaum ein Feld der lebenswissenschaftlichen, humanbiologischen und sogar medizinischen Grundlagenforschung in dem nicht auf das *Drosophila*-Modell zurückgegriffen wird. Im Laufe der Jahrzehnte führte dies dazu, dass die Taufliege heute zu den bestuntersuchten Organismen zählt. Auf den ersten Blick scheint die Idee ungewöhnlich, ein Insekt als Modell für die Erforschung humanbiologischer Fragestellungen einzusetzen, lässt man die äußeren morphologischen Unterschiede jedoch einmal außer Acht, offenbart sich eine Vielzahl an Mechanismen, die sich in Mensch und Fliege kaum unterscheiden. Dieser hohe Grad der evolutionären Konservierung genetischer, zellulärer und metabolischer Prozesse prädestiniert *Drosophila* für derartige Untersuchungen. Von den 13500 Genen der Fliege sind mindestens 60 % homolog zu menschlichen Genen. Da *Drosophila* einen ursprünglicheren Bauplan aufweist als das Säugetier, sind viele der zellulären Prozesse in ihr einfacher organisiert, sie bieten einen schnellen experimentellen Zugang und somit eine exzellente Möglichkeit, grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen. Der kurze Generationszyklus erlaubt zudem eine schnelle genetische Manipulation und zahlreiche Expressionssysteme eröffnen ein außergewöhnlich breites methodisches Spektrum.

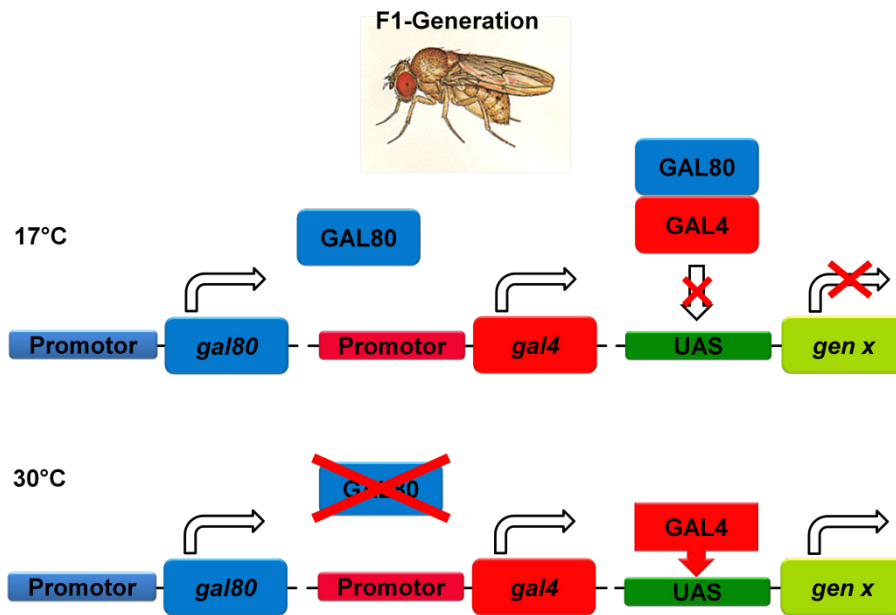
### 1.2.1 Experimentelle Möglichkeiten im Modell *Drosophila*



**Abb. 1.2: Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem in der Taufliede**

Das GAL4/UAS-Expressionssystem ermöglicht eine gewebsspezifische Genaktivierung. Dies erfolgt durch die gezielte Kreuzung einer Treiberlinie, in der die Expression des *gal4*-Gens unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors steht, mit einer Effektorlinie, die das zu untersuchende Zielgen unter der transkriptionellen Kontrolle der UAS-Sequenz trägt (rice.bio.indiana.edu).

*Drosophila* zeichnet sich durch die große Vielfalt an genetischen und molekularbiologischen Techniken aus. Das wohl am häufigsten eingesetzte Werkzeug ist das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem [1], das seinen Ursprung in der Hefe hat. Das System wurde von Brand und Perrimon in *Drosophila* etabliert und gestattet es, beliebige Gene gezielt in spezifischen Geweben oder Organen zu exprimieren und dadurch untersuchen zu können. Grundlage dieses Systems ist die Kombination zweier Fliegenlinien, der Treiber- und der Effektorlinie, durch einfache Kreuzung (Abb. 1.2). Die Treiber- oder GAL4-Linien weisen ein organspezifisches Expressionsmuster auf und können unter Einfluss des GAL4-Transkriptionsfaktors eine gewebe- bzw. organspezifische Expression eines Zielgens dirigieren. In den Effektor- oder UAS-Linien stehen Expressions- oder RNAi-Konstrukte beliebiger Gene unter der transkriptionellen Kontrolle der UAS-Domäne (*upstream activation sequence*). In der ersten Filialgeneration (F1) solcher Kreuzungen wird das GAL4-Protein ausschließlich im gewünschten Gewebe synthetisiert und interagiert mit seiner korrespondierenden UAS-Sequenz, wodurch es die ebenfalls organspezifische Expression des Zielgen-Konstrukts induziert.



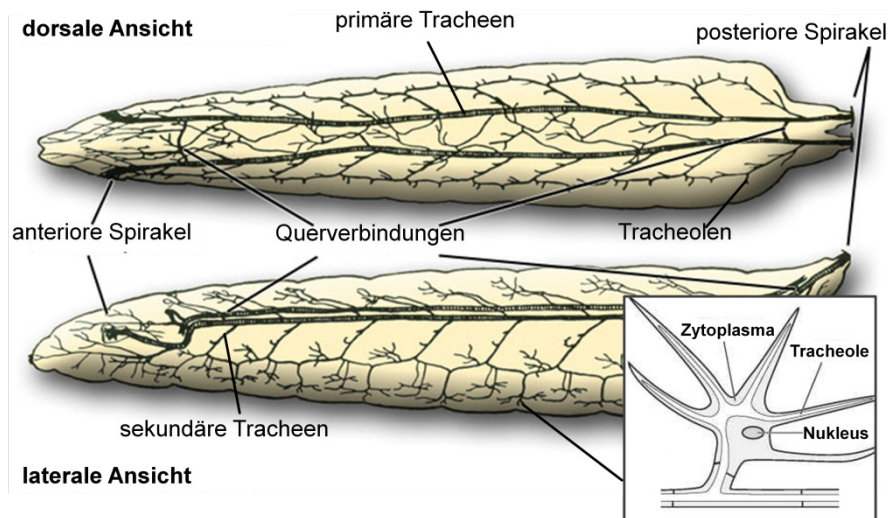
**Abb. 1.3: Das TARGET-Expressionssystem in der Taufleie**

Das TARGET-System (*temporal and regional gene expression targeting*) ist eine Erweiterung des binären GAL4/UAS-Systems um eine temperatursensitive Komponente, den GAL80ts-Inhibitor. Das konstitutiv synthetisierte GAL80ts-Protein entfaltet bei einer permissiven Temperatur (17°C) seine inhibitorische Wirkung auf den GAL4-Transkriptionsfaktor und blockiert die Aktivierung des GAL4/UAS-Systems. Eine restriktive Temperatur von 30°C führt zur Inaktivität des GAL80ts und zur Aktivierung des binären GAL4/UAS-Systems. Es erlaubt somit eine genaue zeitliche Steuerung der Zielgenexpression (rice.bio.indiana.edu).

Seit einigen Jahren findet eine Erweiterung des binären GAL4/UAS-Systems Anwendung, das als TARGET-Expressionssystem (*temporal and regional gene expression targeting*) [2-4] bezeichnet wird. Der Einsatz des TARGET-Expressionssystems ermöglicht unter Beibehaltung der räumlichen Spezifität zusätzlich eine zeitlich genau definierte Genaktivierung, was durch eine temperatursensitive Form des GAL4 inhibierenden Faktors GAL80 gewährleistet wird - GAL80ts. Das GAL80ts-Konstrukt ist Bestandteil der Treiberlinie und wird in identischer Weise durch Kreuzung mit einer Effektorlinie kombiniert. In der F1-Generation wird das temperatursensitive GAL80ts, je nach Wahl des Promotors, organspezifisch oder im ganzen Tier produziert. Bei einer Temperatur von 17°C entfaltet das GAL80ts-Peptid seine inhibitorische Aktivität und blockiert GAL4 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, wodurch das GAL4/UAS-System und die organspezifische Expression des Zielgens blockiert werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 30°C führt zur Inaktivierung des GAL80ts und damit zur Aktivierung des GAL4/UAS-Systems (Abb. 1.3). Dieser Prozess ist reversibel, wodurch sowohl der Zeitpunkt als auch der Zeitraum der Zielgen-Expression spezifiziert werden kann.

### 1.2.2 Das respiratorische System der Fliege ist das funktionelle Analogon der menschlichen Lunge

Die Atemorgane von *Drosophila*, wie auch aller anderen terrestrisch lebenden Insekten, werden als Tracheen bezeichnet. Während die Imago über ein stark verzweigtes mit Luftkammern versetztes bilateral symmetrisches Tracheennetz verfügt, bestehen die Tracheen der Larven aus zwei Strängen, die sich parallel zueinander auf der dorsalen Körperseite vom anterioren zum posterioren Ende erstrecken (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Tracheen der *Drosophila*-Larve**

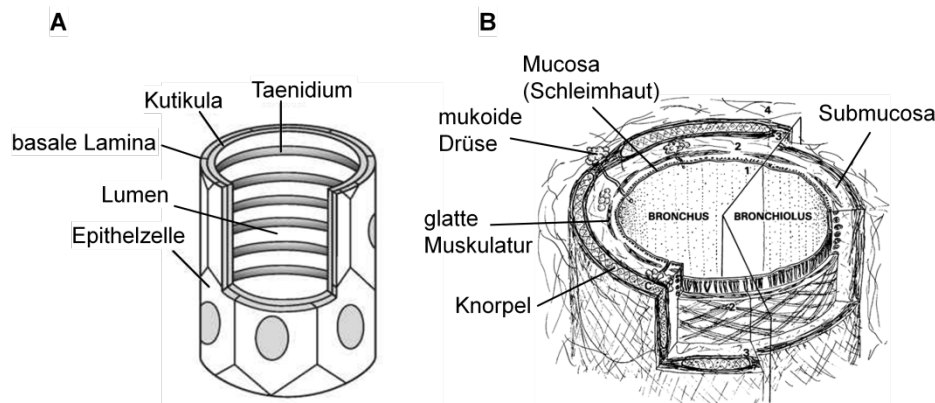
Im Larvenstadium besteht das Tracheensystem in Anpassung an die einfache Anatomie aus zwei, das Tier durchziehenden, Röhren. Sie weisen eine festgelegte Anzahl von primären Ästen auf, die sich wiederum verzweigen und das Gewebe durch Diffusion mit Sauerstoff versorgen. (verändert nach <http://flymove.uni-muenster.de>)

An den Enden der Larve münden die beiden primären Tracheenstränge in verschließbaren Atemöffnungen, den sogenannten Spirakeln, über die der Gasaustausch mit der Umwelt stattfindet. Die primären Tracheen bilden nach Innen und in lateraler Richtung stereotype Verzweigungen: die sekundären Tracheen, diese verzweigen sich weiter zu feinen intersegmentalen Ästen. Die feinsten Verästelungen der Tracheen werden von den zytoplasmatischen Ausläufern terminaler Epithelzellen gebildet und treten mit Zellen anderer Gewebe unter Bildung eines Geflechtes in Kontakt. Der Gasaustausch und -transport, der in höheren Organismen durch das Blut erfolgt, findet in Insekten direkt durch Diffusion und semipassiv statt (Abb. 1.4).

Das stark verzweigte tubuläre Gewebe der Tracheen wird nach innen von einer dünnen Kutikula und einem kutikulären Gerüst (Taenidien) begrenzt. Die Taenidien ziehen sich spiralförmig durch die gesamten Tracheen und verleihen diesen ihre Form und halten das luftgefüllte Lumen offen. Nach außen wird das Organ von einer Schicht ektodermaler Epithelzellen umkleidet (Abb. 1.5 A).



In ihrer Architektur sind Tracheen der Taufliege menschlichen Bronchien erstaunlich ähnlich. Die formgebende Aufgabe wird in Bronchien von glatten Muskeln und Knorpel übernommen. Das Lumen der Bronchien kleidet ein zweischichtiges Epithel aus, unterteilt in die innen liegende Mucosa und die ihr aufliegende Submucosa. Das Epithel ist durchsetzt von mukoiden Drüsen, die ins Lumen sezernieren.



**Abb. 1.5: Morphologie der Atemwege von Taufliege und Mensch**

Schematische Darstellung der larvalen Tracheen einer Fliege (A) sowie eines humanen Bronchus und Bronchiolus (B). Tracheen werden von einem einschichtigen Verbund von Epithelzellen gebildet. Innen befindet sich eine spiralförmige Chitinstruktur, die den Tracheen ihre Form gibt und das luftgefüllte Lumen offen hält (A). In seiner Architektur weisen die Tracheen eine verblüffende Ähnlichkeit zu Bronchien und Bronchiolen des Menschen auf. In den Bronchien übernehmen glatte Muskelzellen und Knorpel die Funktion der Formgebung. Das Lumen besteht wie bei *Drosophila* aus Epithelzellen, mit dem Unterschied, dass sie zweischichtig vorliegen (Mucosa und Submucosa) und von mukoiden Drüsen durchsetzt sind (B). (B verändert nach Lippincott, Williams and Wilkins, *Gen. Thoracic Surgery*, 2005)

Bei einer eingehenden Analyse der Atemwege der Fliege ergaben sich weitere überraschende Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Atemwegsepithel auch im Hinblick auf zellbiologische Prozesse. Es zeigte sich, dass drei auch aus dem Humansystem bekannte immunrelevante Signalwege in den Atemwegsepithelzellen von *Drosophila* funktionell aktiv sind. Dabei handelt es sich um die JNK- und Jak/STAT-Signalwege, sowie einen der beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege (*nuclear factor of kappa light chain enhancer in B-cells*), nämlich den IMD-Signalweg (*immune deficiency*). Dieser ist der einzige in den Epithelzellen funktionelle Signalweg, der NF- $\kappa$ B-Faktoren aktivieren kann [5],[6].

### 1.3 Das Immunsystem von *Drosophila melanogaster*

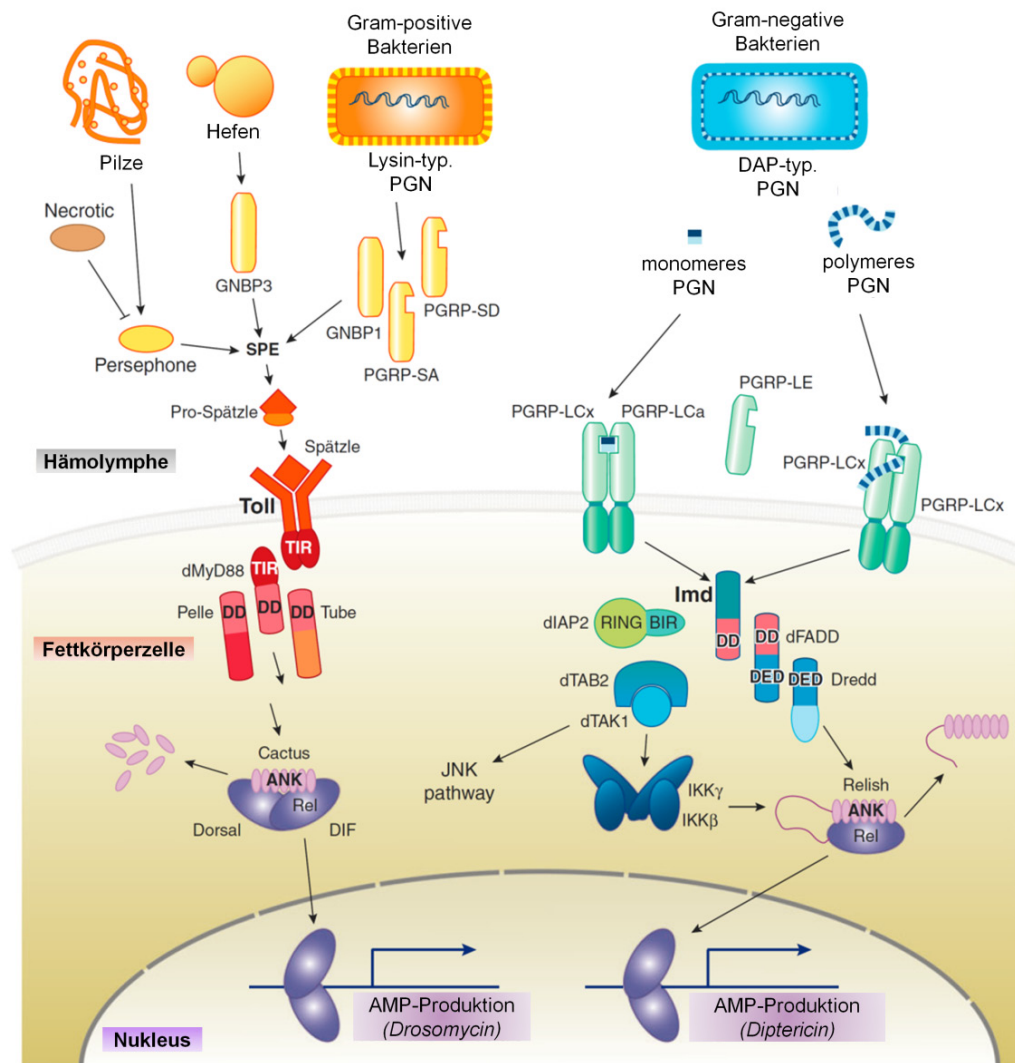
Der letzte gemeinsame Vorfahre von Insekten und Säugern lebte vor etwa 540 Millionen Jahren und verfügte bereits über ein Immunsystem. Aus diesem hat sich das angeborene Immunsystem der heute lebenden Nachfahren entwickelt, wobei es in beiden Klassen weitgehend konserviert geblieben ist. Im Laufe der Evolution ist in Vertebraten zusätzlich

ein adaptives Immunsystem entstanden, das Insekten vollständig fehlt. Die Ursprünglichkeit des angeborenen Immunsystems ermöglicht es *Drosophila* als Modellorganismus zu nutzen [7].

Eine erste Verteidigungslinie gegen Umwelteinflüsse und Pathogeninvasionen stellen die äußere Kutikula, sowie Epithelien des respiratorischen Systems und der Verdauungs-, Malpighi- und Reproduktionsorgane dar. Wird diese physische Barriere durchbrochen, übernehmen spezialisierte Zellen und Gewebe die nächste Verteidigungslinie. In *Drosophila* fällt diese Aufgabe den Hämozyten sowie dem Fettkörper zu, der für die humorale Immunantwort zuständig ist [8]. Das Kennzeichen der humoralen Immunantwort ist die Synthese von Antimikrobiellen Peptiden (AMPs), die über die NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden Toll und IMD induziert wird [9] (Abb. 1.6). Bei den AMPs handelt es sich um nur wenige kDa große kationische Peptide mit einem breiten Wirkspektrum gegen verschiedene Mikroorganismen [10],[11]. Nicht nur der Fettkörper, das Hauptimmunorgan der Taufliege, sondern auch Epithelzellen und Hämozyten sind in der Lage AMPs zu synthetisieren [12],[13]. Epithelien antworten auf eine Pathogeninvasion oder Verletzungen durch eine lokale AMP-Freisetzung. Eine systemische Infektion hat hingegen eine Freisetzung von großen Mengen AMPs aus dem Fettkörper in die Hämolymphe zur Folge, wodurch sie durch den gesamten Organismus zirkulieren können [14].

Die zelluläre Immunantwort in *Drosophila* ist durch die Präsenz von Hämozyten gekennzeichnet. Diese unterteilen sich in Lamellozyten, Plasmatozyten und Kristallzellen, die sich in der Hämolymphe frei bewegen oder aber insbesondere in adulten Tieren an Organe gebunden vorliegen [13]. Neben der Synthese von AMPs sind Hämozyten einerseits in der Lage, eingedrungene Pathogene durch Phagozytose zu bekämpfen und andererseits melanotische Strukturen zu bilden, die den Eindringling einschließen. Die Melanisierung ist neben der AMP-Freisetzung und Phagozytose der dritte wichtige Mechanismus des Arthropoden-Immunsystems. Der Prozess der Melanisierung ist eine akute Reaktion auf eine Pathogeninvasion. Ausgehend von der Erkennung des Mikroorganismus durch mustererkennende Rezeptoren (PRR; *pattern recognition receptor*) wird eine Proteasekaskade in Gang gesetzt, wodurch Monophenole zu Diphenolen und Quinonen oxidiert werden, welche durch Polymerisation Melanin bilden. Das Melanin wird um das Pathogen abgelagert und kapselt es auf diese Weise ein. Der Prozess der Melanisierung führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS; *reactive oxygen species*), die möglicherweise eine direkte toxische Wirkung auf Mikroorganismen haben. Des Weiteren werden infolge der Melanisierung weitere Immunreaktionen aktiviert, die unter anderem in der Synthese von AMPs resultieren [15-18].

### 1.3.1 NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden und Antimikrobielle Peptide



**Abb. 1.6: Darstellung der Toll- und IMD-Signalkaskaden im Fettkörper von *Drosophila***  
(verändert nach Lemaitre und Hoffmann, 2007 [13])

Die Synthese Antimikrobieller Peptide ist der zentrale Verteidigungsmechanismus der Fliege gegen eindringende Mikroorganismen und wird durch zwei intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert - den Toll- und den IMD-Signalweg [13] (Abb. 1.6). Dabei besteht bei der Aktivierung eine generelle Abhängigkeit vom invadierenden Pathogen. Während der Toll-Signalweg durch Komponenten Gram-positiver Bakterien, Hefen und Pilze aktiviert wird, induzieren Gram-negative Invasoren den IMD-Weg.

Unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors Dorsal erfüllt die Toll-Signalkaskade neben ihrer immunologischen Funktion auch eine Schlüsselrolle während der Embryogenese, indem sie an der Entstehung der dorsoventralen Achse des Embryo beteiligt ist [19]. In späteren Stadien nimmt sie jedoch eine entscheidende Rolle im Immunsystem von *Drosophila* ein. Die Aktivierung beider Signalwege erfolgt durch Erkennung und

Wechselwirkung spezieller Mustererkennungsrezeptoren PRRs mit Oberflächenstrukturen eindringender Mikroorganismen, den sogenannten PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Im Falle der Toll-Signalwegaktivierung können es sowohl das Lysin-haltige Peptidoglykan (Lysin-ty. PGN) Gram-positiver Bakterien als auch fungale Strukturen sein. Diese interagieren mit extrazellulären löslichen Rezeptoren wie GNBP (Gram-negative binding protein) oder PGRPs (*peptidoglycan recognition protein*), wodurch eine proteolytische Kaskade aktiviert wird, welche schließlich in der Spaltung des Liganden Spätzle mündet [20],[21]. Erst die Wechselwirkung des prozessierten Spätzle mit der extrazellulären Domäne des Toll-Rezeptors induziert die Signalweiterleitung. Infolge einer Dimerisierung des Toll-Rezeptors wird ein intrazellulärer Komplex, bestehend aus den Adapterproteinen MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), Tube sowie der Serin/Threonin-Kinase Pelle, rekrutiert. Die Kinaseaktivität des Proteins Pelle führt zur Phosphorylierung des *Drosophila* I $\kappa$ B (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) Faktors Cactus und letztlich zu dessen Abbau. In seiner nicht phosphorylierten Form liegt Cactus gebunden an die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren DIF (*dorsal-related immunity factor*) und/oder Dorsal vor, wodurch es ihre Aktivität inhibiert. Erst die Degradierung von Cactus erlaubt eine Migration dieser Transkriptionsfaktoren in den Kern, wo sie an  $\kappa$ B-Sequenzen in Promotorregionen der AMP-Gene binden und ihre Expression induzieren [22]. Anders als bei der Aktivierung des Toll-Weges bedarf die Aktivierung der IMD-Signalkaskade keiner vorgeschalteten Aktivierung eines körpereigenen Liganden. Extrazelluläre lösliche (PGRP-LE) und membranständige (PGRP-LC) Rezeptoren [23–27] interagieren direkt mit Diaminopimelin-haltigem Peptidoglykan (DAP-ty. PGN) Gram-negativer Bakterien und induzieren auf diese Weise eine Signalweiterleitung an das intrazelluläre Adaptermolekül IMD [28]. Eine Interaktion von IMD mit dFADD (*Drosophila fas-associated death domain*) führt zur Aktivierung der Caspase DREDD (*death-related ced-3/nedd2-like protein*). Gleichzeitig wird der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor Relish durch den IKK-Komplex phosphoryliert, welcher in einem TAK1-abhängigen Prozess aktiviert wird. Erst das phosphorylierte Relish wird durch die Caspase DREDD endoproteolytisch geschnitten [12]. Während das C-terminale REL-49-Fragment im Zytoplasma verbleibt, transloziert das N-terminale REL-68 in den Kern und interagiert wie DIF und Dorsal mit  $\kappa$ B-Domänen Antimikrobieller Peptid-Gene [29].

Eine allgemeingültige Unterteilung der sieben Familien der *Drosophila* AMPs in Toll- bzw. IMD-aktivierte AMPs ist kaum möglich. Traditionell wird postuliert, dass eine Konfrontation mit Gram-negativen Bakterien in der Transkription von Cecropin, Attacin, Drosocin und Diptericin resultiert. Kontakt mit Gram-positiven Bakterien hingegen führt zur Defensin-Synthese und Pilze induzieren die Ausschüttung von Metchnikowin und Drosomycin [11].

Jüngste Forschungsergebnisse konnten aufdecken, dass die Promotorregionen aller AMP-Gene über ein Sortiment leicht abgewandelter  $\kappa$ B-Domänen, bestehend aus DIF-, Dorsal- und Relish-spezifischen Sequenzen oder unspezifischen Sequenzen, verfügen. Diese erlauben eine Aktivierung sowohl durch Dorsal als auch durch Relish [30]. Die Natur der  $\kappa$ B-Sequenzen eines AMP bestimmt, ob es sich um ein Toll-aktiviertes (*drosomycin*) [13] oder ein IMD-Signalweg-aktiviertes Gen handelt (*diptericin*) [13] oder ob es durch beide Kaskaden induziert werden kann (*attacin*, *metchnikowin*) [30]. Aber selbst so ist eine strikte Unterteilung nicht möglich, wie die Expression von *drosomycin* zeigt, welches bisher als ein ausschließlich Toll-induziertes AMP bekannt war. Zwischenzeitlich konnte demonstriert werden, dass eine optimale *drosomycin*-Expression die Beteiligung beider Signalwege erfordert [22]. Des Weiteren ist der Aktivierungsweg gewebsabhängig. So ist die *drosomycin*-Expression im respiratorischen Epithel der Tracheen ein rein IMD-abhängiger Prozess und geht gänzlich Toll-unabhängig vonstatten [31-33].

Wie man anhand dieser beiden Reaktionskaskaden bereits erahnen kann, ist die Immunantwort in *Drosophila* ein komplexes und ineinander verstricktes Netzwerk, das auch gewebsspezifische Besonderheiten aufweist und in seinen möglichen Wechselwirkungen bisher nur oberflächlich verstanden ist.

### 1.3.2 JNK- und Jak/STAT-Signalwege

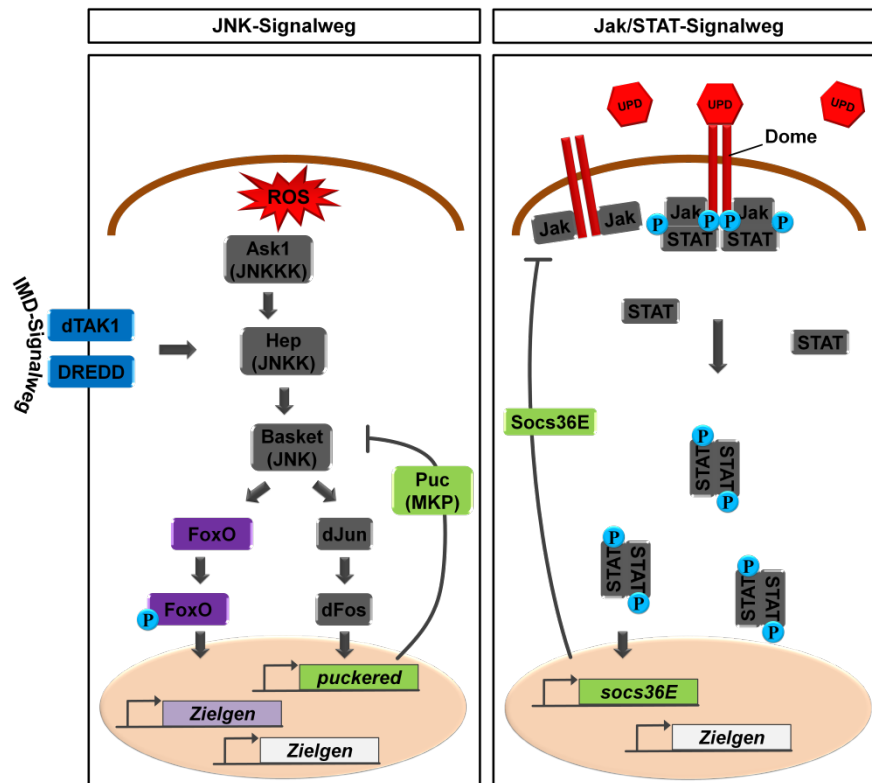
Eine Reihe solcher Wechselwirkungen konnten im Laufe der letzten Jahre identifiziert werden. Beispielsweise sind die Funktionen der Kinase TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1*) und der Caspase DREDD als wichtige Komponenten des IMD-Signalweges gut erforscht [13]. Wie aber inzwischen bekannt ist, sind sie auch für die Aktivierung eines weiteren immunrelevanten Signalweges - des JNK-Weges - von essentieller Bedeutung [34-36]. Neben den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren, spielen auch AP1 (*activating protein 1*) und STAT (*signal transducers and activators of transcription*) eine bedeutende Rolle in der Synthese von Immuneffektormolekülen im Verlauf einer Immunantwort in *Drosophila*. Diese werden durch zwei weitere zentrale Signaltransduktionskaskaden des angeborenen Immunsystems von *Drosophila* aktiviert - den JNK- und Jak/STAT-Signalweg [13],[37].

Der c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalweg ist ein evolutionär konservierter Prozess [38]. Während der Embryonalentwicklung ist er für den Dorsalschluss verantwortlich, in späteren Entwicklungsstadien liegt seine primäre Funktion in der Immunantwort [39] und der Aktivierung Stress-protektiver Proteine [34]. Dabei erfährt der JNK-Signalweg seine Aktivierung entweder durch TAK1 und DREDD, in Kohärenz mit der Induktion der IMD-

Immunantwort [34-36],[42] oder aber in Form von exogenem Stress [41-44]. Die Interaktion zwischen dem JNK-Signalweg und der NF- $\kappa$ B-gesteuerten Immunantwort ist mittlerweile gut charakterisiert. Zum einen konnte die Signalweiterleitung zwischen TAK1 und der JNK-Phosphorylierung aufgeschlüsselt werden [34],[35], zum anderen sind Fliegen, die einen Defekt in der JNK-Signalkaskade aufweisen, nicht in der Lage auf eine Infektion adäquat mit der Expression von AMPs zu reagieren. Dies führte zu der Annahme, dass eine gegenseitig regulierende Interaktion zwischen dem IMD- und JNK-Signalweg besteht [40],[45]. Ein weiteres beachtenswertes und noch immer nicht gänzlich verstandenes Phänomen ist die Aktivierung des JNK-Weges durch xenobiotische und oxidative Stressoren wie beispielsweise reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) und seine zytoprotektive Funktion [41]. Unterschiedliche Stimulanzen aktivieren selektiv bestimmte Mitglieder der JNK Kinase Kinase Familie (JNKKK). Die Weiterleitung eines ROS-induzierten Signals wird zum Beispiel durch einen Redox-Sensor, unter der Beteiligung der Kinase Ask1, vermittelt [46]. Für andere physiologische Stressoren wurde das Gadd45-Peptid (*growth arrest DNA damage 45*) als Mediator identifiziert [47]. In jedem Fall setzt der Sensor eine MKK-Phosphorylierungskaskade in Gang, die letztlich in der Aktivierung von Hep (JNKK/Hemipterous) mündet. Hep wiederum agiert als Aktivator der Jun-Kinase (JNK/Basket), die durch duale Threonin/Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird. JNK verfügt über eine Anzahl zytoplasmatischer und nukleärer Zielproteine, die es ebenfalls durch Phosphorylierung mobilisiert. Zu diesen gehören Transkriptionsfaktoren wie dFos und dJun, Letzterem wird eine entscheidende Rolle bei der AMP-Expression und Melanisierung zugesprochen [48] oder auch das Forkhead Box-Protein FoxO (Kapitel 1.5) [49-51]. Ein wichtiges dFos-Zielgen ist *puckered*, das eine MAPK Phosphatase (MKP) kodiert, welche JNK durch Dephosphorylierung deaktiviert und somit den JNK-Signalweg in einem Rückkopplungsmechanismus inhibiert [52]. Weitere Zielgene sind die große Gruppe der Autophagie-relevanten Gene ATGs (*autophagy-related genes*), die vermutlich infolge einer ROS-induzierten FoxO-Aktivierung exprimiert werden [41] (Abb. 1.7).

Einst durch seine Funktion bei der Segmentierung im Laufe der Embryonalentwicklung von *Drosophila* entdeckt [53],[13], weiß man heute, dass auch der Jak/STAT-Signalweg gleichermaßen für die Expression einer Reihe immunresponsiver Gene im Verlauf einer Immunprovokation unerlässlich ist [54]. Ähnlich wie für den JNK-Signalweg beschrieben, kann auch der Jak/STAT-Signalweg eine Aktivierung durch Interaktion mit der NF- $\kappa$ B-Immunantwort erfahren [37],[49]. Primär wird er jedoch durch septische Verletzung, virale Infektion oder aber zellulären Stress mobilisiert [54].





**Abb. 1.7: Modell der JNK- und Jak/STAT-Signalwege in *Drosophila melanogaster***

Eine septische Verletzung beispielsweise leitet die verstärkte Expression der Gene Zytokin-ähnlicher Peptide der UPD Familie (*unpaired*) und ihre Sekretion in die extrazelluläre Matrix ein [55]. Der genaue Mechanismus, insbesondere der einer stress-induzierten UPD-Aktivierung, ist Gegenstand aktueller Forschungen und noch wenig verstanden. In jedem Fall jedoch wird die Signaltransduktion durch eine Interaktion des Transmembranrezeptors Dome (Domeless) mit UPD initialisiert [56]. Der prädimersierte Rezeptor liegt als Komplex mit der Janus-Kinase (Jak/Hopscotch) vor. Die Ligandenbindung verursacht eine Konformationsänderung und Dimerisierung des Dome-Rezeptors. Das so aktivierte Jak transphosphoryliert Dome und sich selbst, wodurch aktive Zentren für SH2-Domänen des Transkriptionsfaktors STAT92E (*signal transducers and activators of transcription*) geschaffen werden [56]. Zytoplasmatische STAT92E-Monomere werden nun an den Dome/Jak-Komplex rekrutiert. Infolge einer Tyrosin-Phosphorylierung erfährt STAT92E eine Dimerisierung und transloziert als Dimer in den Nucleus, wo es die Transkription von Zielgenen einleitet. Bekannte STAT92E-regulierte Gene sind beispielsweise *socs36E*, ein negativer Autoregulator des Jak/STAT-Weges, außerdem *totA* oder TEP-kodierende Gene (*thioester-containing proteins*) [53],[55] (Abb. 1.7).

## 1.4 Zelluläre Stressantwort von *Drosophila melanogaster*

Im vorangehenden Abschnitt wurde der Begriff Stress als ein wichtiger Induktor von Signaltransduktionskaskaden erwähnt. Hierbei ist Stress von seiner umgangssprachlichen Bedeutung abzugrenzen. Ursprünglich von Hans Selye eingeführt um Reaktionen biologischer Systeme auf Belastung zu beschreiben [57], ist Stress in der Biologie als ein physiologisch belastender Zustand definiert. Dieser kann sich in unterschiedlicher Weise manifestieren, beispielsweise in Form von mechanischem Druck, Toxinen oder dem weiten Feld der Umweltstressoren, mit denen Organismen und Zellen konfrontiert werden. Im Laufe der Evolution haben Organismen zahlreiche Strategien entwickelt auf Stressoren zu reagieren um das Überleben zu sichern [58]. Zwei solcher Mechanismen, der JNK- und der noch wenig erforschte Jak/STAT-Signalweg, wurden bereits vorgestellt. *Drosophila* verfügt aber über weitere Reaktionswege, die auf Stressintervention und Prävention von Folgeschäden spezialisiert sind. Zwei davon werden im Folgenden vorgestellt: der Keap1-Nrf2- und der Insulin/IGF-Signalweg (ILS). Wie die Reaktionskaskaden des Immunsystems liegen auch diese beiden Signalwege in hochgradig konservierter Form in Säugern vor. Doch zuvor soll eine Stressform, die von zentraler Bedeutung für diese Arbeit ist, näher betrachtet werden - der oxidative Stress.

### 1.4.1 ROS, oxidativer Stress und das Immunsystem

ROS (*reactive oxygen species*) bezeichnet freie Sauerstoffradikale und reaktive Sauerstoffverbindungen und steht in enger Korrelation mit dem Begriff oxidativer Stress, obwohl ROS nicht grundsätzlich mit oxidativem Stress gleichzusetzen sind. Sie sind nicht nur ein wichtiger Mediator vieler zellulärer Prozesse [16],[18], sondern auch ein natürliches Produkt der mitochondrialen Elektronentransportkette, wo sie durch Reduktion von O<sub>2</sub>, das als finaler Elektronenakzeptor agiert, entstehen [59]. Unter normalen Umständen findet durch Prozesse, die unter dem Begriff der Redox-Homöostase zusammengefasst werden, eine permanente antagonisierende Adaptation statt [60]. Diese Balance zwischen ROS-Produktion und Detoxifikation wird unter anderem durch persistente molekulare Mechanismen aufrechterhalten, die sich spezialisierter Enzyme, wie Catalase, Superoxiddismutasen, Thioredoxin oder Enzyme des Glutathionsystems bedienen [60]. Aus vielerlei Gründen kann diese Balance aus dem Gleichgewicht geraten. Reichern sich dann ROS in der Zelle an, spricht man von oxidativem Stress. Die Gründe können intrinsischer Natur sein, entweder durch eine Abnahme der Antioxidantien- oder Zunahme der ROS-Produktion oder aber durch extrazelluläre ROS-generierende Quellen, wie ultraviolette und ionisierende Strahlung, Toxin-Exposition (beispielsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder

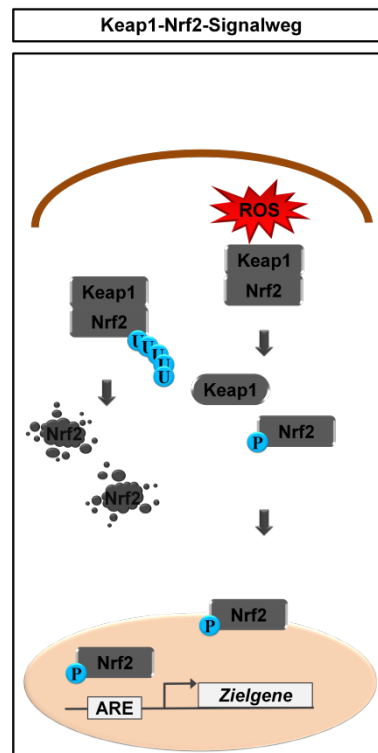


Paraquat) [61] oder direkte Aufnahme aus der Atmosphäre (Ozon). Unter diesen Umständen können ROS-Ionen eine schädigende Wirkung auf den Organismus haben, indem sie direkt Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren angreifen [62]. In Abhängigkeit von der Stärke des oxidativen Stresses können zwei generelle Folgemechanismen aktiviert werden: entweder Rettungsmechanismen, die eine Detoxifizierung, Wiederherstellung der Redox-Balance oder Reparaturprozesse initiieren [62] oder bei einer schwerwiegenden ROS-Belastung Signaltransduktionskaskaden, die in Autophagie [41] und als Ultima Ratio im Zelltod durch Apoptose [46],[52] resultieren. Die Regulation dieser Prozesse wird durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege vermittelt, die als zelluläre Stressantwort zusammengefasst werden. Zu ihnen zählen der JNK-, Jak/STAT-, Keap1-Nrf2- und Wnt-Signalweg [63-67]. Mehrere dieser Wege münden in der Aktivierung des Forkhead Box-Transkriptionsfaktors FoxO. Obwohl dessen Funktion noch immer nicht vollends geklärt ist, erweist FoxO sich mehr und mehr als ein zentraler Faktor der zellulären Stressantwort, wie nachfolgend noch näher erläutert wird.

Eine ROS-Fehlsteuerung ist nicht nur von grundlegendem zellbiologischem Interesse, sondern auch eng mit zahlreichen Krankheiten assoziiert. Hierzu zählen neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer und Parkinson [62],[68], sowie Karzinom- und Herzerkrankungen oder Diabetes [69]. Interessanterweise konnten jüngste Studien ROS auch als einen der Verursacher der Atemwegsentzündung bei Asthma und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) identifizieren [70],[71].

#### 1.4.2 Keap1-Nrf2-Signalweg

Die Keap1-Nrf2-Signalkaskade wurde in den vorangegangenen Kapiteln bereits als eine weitere Signalkaskade der zellulären Stressantwort erwähnt und soll hier detailliert vorgestellt werden (Abb. 1.8). Dieser regulatorische Weg nimmt eine zentrale Rolle in der Protektion der Zelle gegen Schäden, die insbesondere durch oxidativen Stress verursacht werden, ein [67]. Diese vergleichsweise einfach aufgebaute und hochgradig konservierte Kaskade verfügt über nur zwei elementare Komponenten: den Transkriptionsfaktor Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) und seinen Inhibitor Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*). Bei Nrf2 handelt es sich um einen *basic leucin zipper* Cap-n-collar-Transkriptionsfaktor. Dieser wurde erstmals in *Drosophila* als essentieller Bestandteil der Segmentierung und Entwicklung des posterioren Kopfes nachgewiesen und in Bezug darauf als Cap-n-collar (Cnc) benannt [72],[73]. Heute ist bekannt, dass Nrf2 auch eine Vielfalt unterschiedlicher ROS-induzierter zellulärer Reaktionen integrieren kann [74].



**Abb. 1.8: Modell des Keap1-Nrf2-Signalweges in *Drosophila melanogaster***

Unter Normalbedingungen liegt der Transkriptionsfaktor, gebunden an seinen Suppressor Keap1, als zytoplasmatischer Komplex vor. Dabei wird Nrf2 einem fortwährenden proteasomalen Abbau ausgesetzt, der durch eine Keap1-regulierte Polyubiquitinierung vermittelt wird [67],[75]. Unter oxidativen Stressbedingungen übernimmt der Keap1-Inhibitor selbst die Funktion eines Sensors und reagiert auf Störungen der Redox-Homöostase. Dabei kommt es infolge einer direkten Interaktion mit reaktiven Ionen, wie ROS oder Elektrophilen zur Oxidation und somit zu einer Konformationsänderung des Keap1-Proteins. Infolgedessen und einer gleichzeitigen Phosphorylierung dissoziiert Nrf2 von seinem Repressor [75]. Nrf2 transloziert daraufhin in den Zellkern, wo es durch Interaktion mit der Konsensussequenz ARE (*antioxidant response element*) in der Promotorregion seiner Zielgene, die zumeist detoxifizierende Enzyme kodieren, deren Transkription induziert [74]. Der Keap1-Nrf2-Signalweg reguliert im Menschen die Transkription von 32 Genen und ist nachweislich ein wichtiger Antagonist der durch oxidativen Stress hervorgerufenen Folgen, wie die zuvor bereits erwähnten Krankheitsbilder [76],[77]. In *Drosophila* wurde der Signalweg von Sykietis und Bohmann charakterisiert und eingehend in seiner Funktion untersucht. Keap1-Nrf2 ist nicht nur der Hauptsignalweg der zellulären Stressantwort, wobei er antioxidative und detoxifizierende Prozesse induziert [66], neuere Studien konnten darüber hinaus Wechselbeziehungen zwischen Nrf2 und der Insulin/IGF-Signalkaskade [78] sowie dem Transkriptionsfaktor

FoxO [79] aufdecken, wodurch das Signalweg-überspannende Netzwerk der Antwort auf oxidativen Stress mehr und mehr aufgeklärt wird.

### 1.4.3 Insulin/IGF-Signalweg

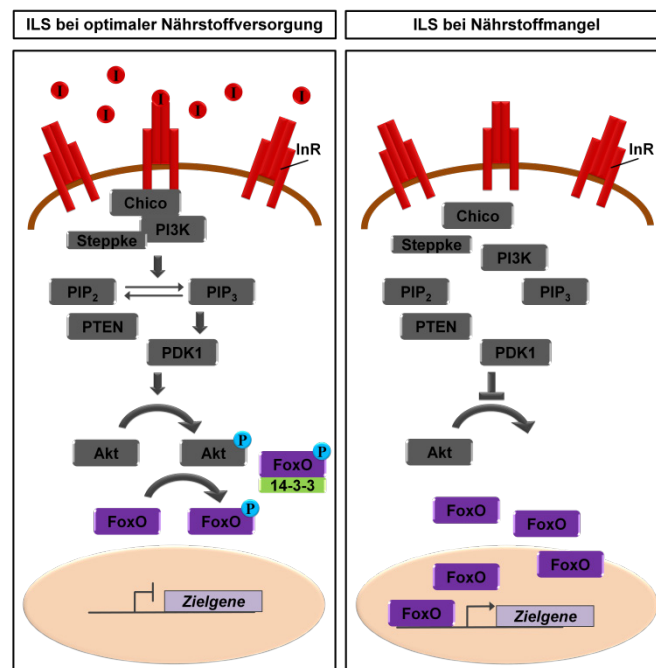
Bei Vertebraten und Invertebraten dient das Hormon Insulin gleichermaßen als wichtiger Regulator des Energiehaushaltes, der zellulären Proliferation und der Biosynthese funktioneller Moleküle [78]. Dies geschieht, indem Insulin als Ligand einen elementaren Signalweg des zellulären Metabolismus aktiviert, die Insulin/IGF-Signaltransduktionskaskade (ILS) [80]. Insulin bezeichnet im Allgemeinen das Proteohormon der Vertebraten, während die homologe Proteinfamilie in *Drosophila* zumeist durch die Bezeichnung dILP (*Drosophila insulin-like peptide*) [81],[82] davon abgegrenzt wird. Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf eine Differenzierung jedoch verzichtet.

Wie in Abschnitt 1.4.2 erwähnt, ist Insulin und die Aktivierung der Insulin/IGF-Signalkaskade offenbar auch an der oxidativen Stressantwort beteiligt, indem es einer ROS-Bildung entgegenwirkt [78],[83] bzw. durch ROS in seiner Funktion gehemmt wird [84]. Im Folgenden soll jedoch die Regulierung des ILS durch eine weitere Form des Stresses, den Ernährungsstress (*nutritional stress*) näher betrachtet werden. Dieser kann vielerlei Ursachen haben, wie beispielsweise allgemeiner Nahrungsentzug (Hungerstress), subkalorische und hochkalorische Ernährung oder der selektive Entzug bestimmter Nährstoffe.

Die Präsenz von Nährstoffen steht im direkten Zusammenhang mit der Freisetzung von Insulin, das beim Wirbeltier im Pankreas, in *Drosophila* in fast allen Organen wie Mitteldarm, Speicheldrüsen, Fettkörper und in Neurosekretorischen Zellen des Zentralen Nervensystems produziert wird [80],[85] (Abb. 1.9). Insulin interagiert in seiner Funktion als extrazellulärer Ligand mit dem transmembranen Insulin-Rezeptor (InR), worauf dieser autophosphoryliert wird und das Insulin-Rezeptor-Substrat Chico sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an die Zellmembran rekrutiert werden. Die auf diese Weise aktivierte PI3K koordiniert in enger Kooperation mit dem Zytoskelett [86],[87] schließlich die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-Phosphat), das sich im Zytoplasma anreichert und seinerseits die Kinasen PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase 1*) und Akt aktiviert. Der Kinaseaktivität der PI3K wirkt die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) entgegen, die durch ihre dephosphorylierende Aktivität den ILS negativ reguliert [82],[88].

Die Serin/Threonin-Kinase Akt gilt als terminale Komponente der Insulin/IGF-Kaskade und phosphoryliert eine Vielzahl metabolisch relevanter Proteine und Transkriptionsfaktoren, wobei das bereits erwähnte FoxO eines der bedeutendsten ist [82],[89],[90]. Diese

Phosphorylierung dreier konservierter Konsensusregionen [91] im FoxO-Protein führt zu dessen Assoziation mit dem 14-3-3-Chaperon und damit zu einer zytoplasmatischen Retention und funktionellen Deaktivierung. Damit ist FoxO Teil einer Insulin-abhängigen inhibitorischen Rückkopplungsschleife, wobei der Insulin-Rezeptor und Steppke selbst transkriptionelle Ziele von FoxO sind [82]. Zusätzlich reguliert eine FoxO-Translokation die Insulin-Synthese herunter [88], was die Sensitivität des Mechanismus erhöht.



**Abb. 1.9: Modell des Insulin/IGF-Signalweges in *Drosophila melanogaster* bei optimaler Nährstoffversorgung und bei Ernährungsstress**

*Drosophila*-Larven, denen jeder Zugang zu Nährstoffen verwehrt wird, reagieren mit einem Hunger-induzierten Verhaltensmuster (u.a. gesteigerte Futtersuchaktivität), das nachweislich durch eine reduzierte Insulinproduktion ausgelöst wird [82]. Der daraus resultierende Wegfall einer Insulin-InR-Interaktion deaktiviert die Transduktionskaskade mit der Folge, dass Akt in seiner Kinaseaktivität blockiert wird. Das wiederum führt zu einer Translokation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO (Abb. 1.9) [82],[89],[91].

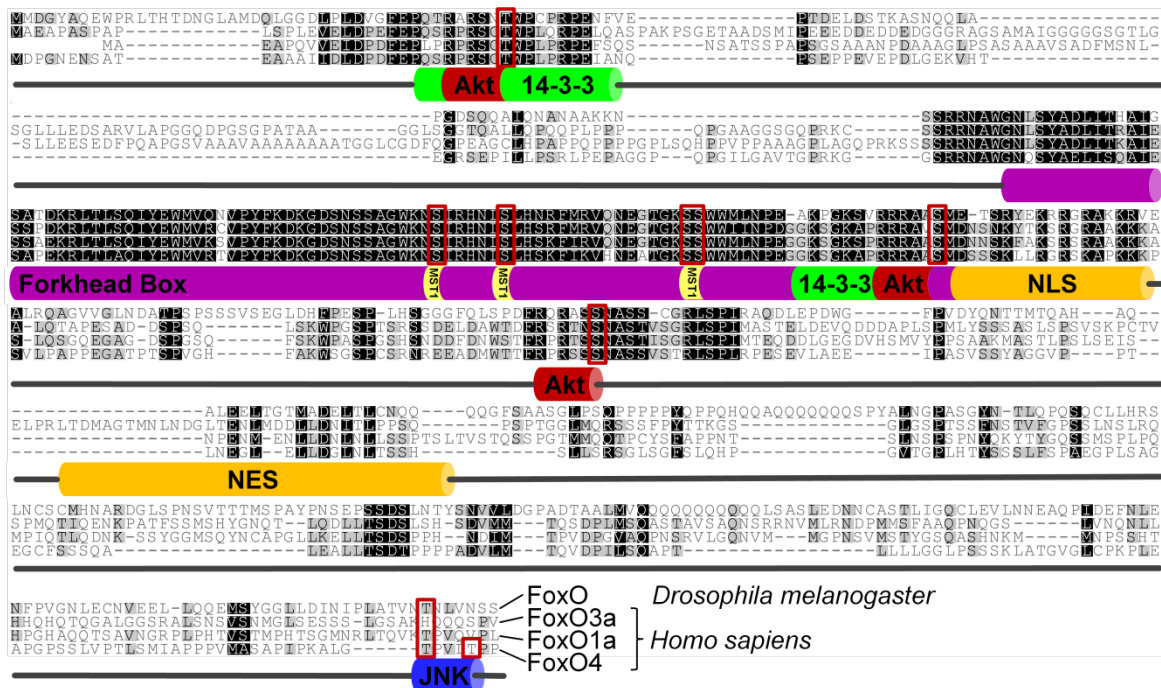
Neuere Untersuchungen belegen eine Verknüpfung der Insulin- und Keap1-Nrf2-Signalwege in ähnlicher Weise wie bereits in Abschnitt 1.4.2 beschrieben. Offenbar induziert nicht nur oxidativer Stress eine Interaktion dieser beiden Signalkaskaden, sondern auch Hungerstress. Somit konnte eine bisher unbekannte metabolische Achse des Keap1-Nrf2-Signalweges charakterisiert werden [151].

## 1.5 Forkhead Box-Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor FoxO ist ein Vertreter der Familie der Forkhead Box-Proteine. Die Gemeinsamkeit und gleichzeitig die namensgebende Komponente dieser Proteine ist eine aus ca. 100 Aminosäuren bestehende DNA-Bindedomäne. Eine Mutation der Forkhead-Domäne in *Drosophila melanogaster*, die einen Forkhead-Phänotyp (*fork* (engl.) = Gabel; *head* (engl.) = Kopf) des Fliegenembryos hervorruft, führte zur Entdeckung der in der Folge als Fox (Forkhead Box) bezeichneten Familie von Transkriptionsfaktoren [92]. Nachfolgend wurde eine Vielzahl weiterer Fox-Proteine identifiziert, die heute mittels einer einheitlichen Nomenklatur in Klassen von A bis R untergliedert werden [93],[94].

### 1.5.1 FoxO – Forkhead Box-Transkriptionsfaktor der Klasse O

Fox-Gene der Gruppe O wurden erstmalig in chromosomalen Translokationen humaner Tumorzellen identifiziert. Während Invertebraten über einen einzigen Vertreter dieser Gruppe verfügen, der im Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Daf-16 und in *Drosophila* als FoxO bezeichnet wird, wurden im Säuger genom vier *foxO*-Gene gefunden. Sie werden als *foxO1a*, *foxO3a*, *foxO4* und *foxO6* benannt [94]. Ihnen allen gemeinsam ist eine negative Regulierung durch die Insulin/IGF-Signalkaskade (siehe 1.4.3) und eine direkte Phosphorylierung durch die Kinase Akt [95] (Abb. 1.9). Bei den FoxO-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um eine evolutionär sehr ursprüngliche und hochkonservierte Gruppe von Proteinen, was auch aus Abbildung 1.9 ersichtlich ist, die eine Gegenüberstellung der drei humanen Vertreter FoxO1a, 3a und 4 mit dem einzigen *Drosophila*-Homolog zeigt. Während die vier aufgeführten Proteine insbesondere im Bereich der Forkhead-, der Akt-Phosphorylierungs-Domäne und der für die subzelluläre Lokalisation verantwortlichen NLS- (*nuclear localization signal*) und NES-Sequenzen (*nuclear export sequence*) eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aufweisen, kommt dem FoxO6-Protein eine Sonderrolle zu. Es unterscheidet sich nicht nur in seiner Proteinsequenz erheblich von den anderen Isoformen, so fehlt beispielsweise die dritte Akt-Phosphorylierungs-Sequenz, wodurch es konstitutiv nukleär lokalisiert ist. Im Gegensatz zu FoxO1a, FoxO3a und FoxO4, die keine Gewebepräferenz zeigen, scheint FoxO6 primär eine Funktion im Nervensystem zu erfüllen [96],[95].



**Abb. 1.9: Abgleich der Aminosäuresequenzen des *Drosophila*-FoxO und der humanen FoxO1a, FoxO3a und FoxO4**

Dargestellt sind die Sequenzen des *Drosophila*-FoxO sowie der FoxO1a-, FoxO3a- und FoxO4-Proteine. Die Hintergrundfarbe gibt den Grad der Ähnlichkeit wieder: schwarz - Sequenzidentität, grau - ähnliche Aminosäuren, weiß - keine Übereinstimmung. Die Ähnlichkeitsdefinition wurde aus dem Programm Geneious Pro 5.3.3 MUSCLE Alignment übernommen. Die Proteinsequenzen wurden durch eine schematische Darstellung der Domänen ergänzt. Rote, gelbe und blaue Zylinder markieren die Akt-, MST1- und JNK-Phosphorylierungs-Motive, die phosphorylierten Serine und Threonine sind durch rote Boxen gekennzeichnet. Grüne Zylinder markieren die 14-3-3-Interaktions-Domänen, orange Zylinder geben die NLS- und NES-Sequenzen wieder und die DNA-bindende Forkhead Box ist violett gekennzeichnet.

Das essentielle Strukturelement der FoxO-Proteine ist die Forkhead Box, die eine Interaktion mit der Konsensus-Sequenz (GTAAAC<sub>T</sub>/A) einer Vielzahl von FoxO-Zielgenen ermöglicht und so deren Expression induziert [95]. FoxO-Proteine verfügen darüber hinaus auch über eine reprimierende Funktion, die jedoch nicht zwangsläufig mit einer Bindung des Proteins an die DNA einhergeht. Dabei wird FoxO gemeinsam mit Cofaktoren an die Promotorsequenzen rekrutiert, wo es die Genexpression in einer noch nicht vollends geklärten Weise inhibiert [95-99].

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen reguliert werden, die durch eine Reihe von Signalwegen dirigiert werden, von denen einige in den letzten Abschnitten bereits vorgestellt wurden. So können FoxO-Proteine beispielsweise phosphoryliert, acetyliert oder mono- und polyubiquitiniert werden. Abhängig von der Position der Modifikation transloziert das Protein in den Kern oder erfährt eine Exklusion. Im Falle einer Polyubiquitinierung wird es einem proteasomalem Abbau unterzogen.

Signalwege, die zu einer FoxO-Phosphorylierung führen sind: 1) Der ILS, der die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert (Abschnitt 1.4.3) durch dessen Phosphorylierung



FoxO aus dem Kern exportiert und infolge einer 14-3-3-Interaktion im Zytoplasma zurückgehalten wird. 2) Der als Antagonist des ILS wirkende JNK-Signalweg, dessen Aktivierung zu einer FoxO-Phosphorylierung durch die Threonin-Kinase JNK (Basket) führt (Abschnitt 1.3.2) und eine nukleäre FoxO-Lokalisation fördert. 3) Der MST1-Signalweg (*mammalian ste20-like kinase 1*), der in erster Linie den durch oxidativen Stress induzierten Zelltod vermittelt [100]. Die Serin-Kinase MST1 (Hippo) phosphoryliert dabei FoxO wodurch der 14-3-3/FoxO-Komplex aufgelöst wird und FoxO in der Kern transloziert.

In Säugerzellen wurde eine Reihe von Coaktivatoren und Corepressoren identifiziert, die FoxO durch Acetylierungs- und Deacetylierungsprozesse regulieren. Beispiele hierfür sind Acetyltransferasen, CBP (*CREB-binding protein*), p300 oder die Deacetylasen aus der Familie der Sirtuine. Eine dritte chemische Modifikation ist die Monoubiquitinierung durch USP7 (*ubiquitin-specific processing protease 7*). Im Gegensatz zu der bereits erwähnten irreversiblen Polyubiquitinierung, führt diese nicht zur Degradierung des Proteins, sondern zu seiner Aktivierung [91]. Neben den regulatorischen posttranslationalen Modifikationen kann das FoxO-Protein durch unterschiedliche Mediatoren in seiner Funktion beeinflusst werden. Einer dieser Mediatoren ist  $\beta$ -Catenin, eine zentrale Komponente des Wnt-Signalweges. Es wird nicht nur während der Entwicklung sondern auch durch oxidativen Stress aktiviert und bindet direkt an FoxO, wodurch es dessen transkriptionelle Aktivität erhöht [63],[64],[91].

Dieser kurze Überblick über die Funktionsweise des FoxO-Proteins zeigt die große Komplexität aus Induktoren, Signalwegen und Mechanismen, die FoxO steuern und Ziel aktueller Forschungen sind. Die Relevanz von FoxO als Forschungsgegenstand ergibt sich nicht nur aus seiner zentralen Rolle in zahlreichen Signalwegen, sondern vor allem auch aus seiner entscheidenden Bedeutung für das Verständnis zahlreicher Krankheitsbilder. So fungiert der Transkriptionsfaktor FoxO neben seiner Funktion als unverzichtbarer Regulator verschiedener zellulärer Prozesse, wie der Energie-[80],[82],[101] Redox- [50],[59] und Immun-Homöostase [102],[103], als ein vielversprechender Tumorsuppressor [104] oder als Schlüsselfaktor bei der Entstehung von Diabetes. Von entscheidender Bedeutung, insbesondere für die Anfertigung dieser Arbeit, sind aktuelle Erkenntnisse, die FoxO in den Fokus der Entstehung von Erkrankungen des Atemwegs-Epithels, wie Tabakrauch-induzierte Entzündung, COPD oder *Asthma bronchiale*, stellen [105].

## 2 Zielsetzung

Organismen interagieren mit der Umwelt über ihre verschiedenen Epithelien. Diese Epithelien, die gleichzeitig eine Barriere darstellen, sind ständig unterschiedlichsten Stressoren, aber auch den Angriffen durch Pathogene ausgesetzt. Aus diesem Grund verfügen sie über spezielle Schutzmechanismen um den Belastungen durch Umweltstressoren entgegenzuwirken und ihre Besiedlung durch Mikroorganismen zu verhindern. Neben physikalischen Schutzfunktionen wie sie zum Beispiel durch Mukusschichten gebildet werden, weisen Epithelzellen spezifische zelluläre Mechanismen auf, um auf Umwelteinflüsse und ihre Folgen adäquat zu reagieren. Ein Defekt dieser Schutzreaktion kann zu vielfältigen Erkrankungen führen, unter diesen sind chronisch-entzündliche Erkrankungen der Epithelien (z.B. *Asthma bronchiale*, COPD, *Morbus Crohn*) und Epithelkarzinome die Wichtigsten.

Das Motiv für die Anfertigung dieser Arbeit waren aktuelle Erkenntnisse, die das Forkhead Box-Protein FoxO in enge Beziehung zu Schutzmechanismen der Zelle bei Stress-einwirkung stellen. Daraus resultierend bestand das erste Ziel dieser Dissertation darin, den Transkriptionsfaktor FoxO als potentiellen Signalgeber einer Stressreaktion in Epithelzellen der respiratorischen Organe zu untersuchen.

Eine zweite, bislang kaum bekannte Funktion des FoxO-Proteins als Regulator der angeborenen Immunantwort in der Taufliege *Drosophila* bildete die Grundlage für die zweite Fragestellung dieser Arbeit. Diese bestand darin, eine generelle Wechselbeziehung zwischen Stressantworten und Immunsystem aufzudecken und die Funktion des FoxO-Faktors in diesem Zusammenspiel aufzuschlüsseln.



## 3 Material und Methoden

In diesem Teil der Doktorarbeit werden alle verwendeten Materialien aufgeführt sowie die angewendeten Methoden beschrieben.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Technische Geräte

Automated Cell Counter Countess<sup>®</sup>; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 Binokular; Zeiss (Jena, Deutschland)  
 BioPhotometer; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
 Brutschrank; Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)  
 Brutschrank innova<sup>™</sup> 4230; New Brunswick Scientific (Edison, USA)  
 Gelkammer; PeqLab GmbH (Erlangen, Deutschland)  
 Gewebehomogenisator Pellet pestles, cordless motor; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)  
 Heizblock Techne DRI-BLOCK<sup>®</sup> DB-2A; Techne (Stone, UK)  
 Heizblock Techne DRI-BLOCK<sup>®</sup> DB-2D; Techne (Stone, UK)  
 Heizthermomixer VWR Advanced VMS-C4; VWR (Darmstadt, Deutschland)  
 inverted confocal laser scanning microscope TCS Sp5; Leica (Wetzlar, Deutschland)  
 Mini-Rolleninkubator 8-60°C, 4020; GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)  
 Mixer IKA<sup>®</sup> VORTEX GENIUS 3; IKA GmbH (Staufen, Deutschland)  
 Pipetten Research<sup>®</sup> 0,2 µl-1000 µl; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
 Pipettierhilfe pipetus<sup>®</sup>-akku; Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)  
 Plattenzentrifuge Sigma 2-6E; Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode, Deutschland)  
*real-time* PCR-Gerät LightCycler<sup>®</sup> 480 II; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 Sterilbank HERAsafe; Heraeus (Hanau, Deutschland)  
 Stereozoom-Mikroskop SZX16 mit DP72 Kamera; Olympus (Hamburg, Deutschland)  
 Stereozoom-Objektive SDF Planapo 1xPF und 2xPFC; Olympus (Hamburg, Deutschland)  
 Stereozoom-Filter SZX2-FUV und SZX2-FGFP; Olympus (Hamburg, Deutschland)  
 Thermomixer comfort; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
 Thermostatschrank AQUALYTIC<sup>®</sup> 4-40°C; Tintometer GmbH (Dortmund, Deutschland)  
 Zentrifuge 5430 R; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
 Zentrifuge Heraeus FRESCO 17; Heraeus (Newport Pagnell, UK)  
 Zentrifuge Hettich EBA 12 R; HettichLab (Tuttlingen, Deutschland)

### 3.1.2 Programme, Datenbanken und bioinformatische Hilfsmittel

Berkeley Drosophila Genome Project <http://www.fruitfly.org>  
 Bloomington Stock Center <http://flystocks.bio.indiana.edu>  
 cellA Imaging Software for Life Science Microscopy; Olympus (Hamburg, Deutschland)  
 FlyBase <http://flybase.org>  
 FlyMove <http://flymove.uni-muenster.de>  
 Geneious Pro 5.3.3  
 ImageJ 1.44o  
 Leica LAS AF Lite; Leica (Wetzlar, Deutschland)  
 LightCycler® 480 SW 1.5; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 MWG eurofins [www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com)  
 NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
 NCBI BLAST [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)  
 PubMed [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)  
 Universal Probe Library [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

6 Well-Platten Costar®; Corning Inc. (Corning, USA)  
 24 Well-Platten Nunclon™ ΔSurface; Nunc™ (Roskilde, Dänemark)  
 96 Well-Platten mit flachem Boden Costar®; Corning Inc. (Corning, USA)  
 Cell Counting chamber slide Countess™; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 Drosophila-Gefäße 68 ml, 33x82 mm; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)  
 Dumont-Pinzetten Nr. 5 Bio; Bioform (Nürnberg, Deutschland)  
 Einwegküvetten; Brandt GmbH Co KG (Wertheim, Deutschland)  
 Einwegskalpelle; B. Braun Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)  
 Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>; Sarstedt (Newton, USA)  
 Homogenisatorspitzen Pellet pestles; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)  
 LightCycler® 480 Multiwell Plate 96; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 LightCycler® 480 Sealing Foil; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 Mikroskopkammern μ-Slide 8-Well ibiTreat; ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)  
 Milbenstopfen (Ø 36 mm); Drosophilacenter (Retzstadt, Deutschland)  
 Petrischalen 35x10 mm mit Nocken; Sarstedt (Newton, USA)  
 Pipetten Costar® Stripette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml; Corning Inc. (Corning, USA)

Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 10 µl, 2-100 µl, 200 µl, 100-1000 µl; Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)  
 Pipettenspitzen Dualfilter T.I.P.S. 0,1-10 µl; Eppendorf (Mannheim, Deutschland)  
 Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes, 1,5 ml, 2,0 ml; Eppendorf (Mannheim, Deutschland)  
 Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml; DB Falcon™ (Franklin Lakes, USA)  
 Sterilfilter 0,22 µm Stericup® & Steritop®; Millipore Corp. (Billerica, USA)

### 3.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Inhibitoren und Kits

#### *Chemikalien und Reagenzien*

Agar-Agar, Kobe I; Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
 Agarose; Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)  
 Aqua ad injectabilia; Braun (Melsungen, Deutschland)  
 Bovine Serum Albumin BSA; PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)  
 Dimethylsulfoxid DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS); Sigma (Deisenhofen, Deutschland)  
 Dithiothreitol DTT (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>); Sigma (Deisenhofen, Deutschland)  
 dNTPs 100 mM dNTP Set PCR grade; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 Einbettungslösung IMM ibidi mounting medium; ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)  
 Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O); Merck (Darmstadt, Deutschland)  
 Ethidiumbromid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>); GIBCO-BRL (Eggenstein, Deutschland)  
 Ethylendiamintetraessigsäure EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>); Serva (Heidelberg, Deutschland)  
 Fötale Kälberserum FCS, inaktiviert bei 56°C, sterilfiltr.; Biochrom (Berlin, Deutschland)  
 Glukose D(+) wasserfrei ≥ 99,5 % Cellpure® (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>); Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
 Hoechst 33342 (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Ox3HClx3H<sub>2</sub>O); Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)  
 LightCycler® 480 SYBR Green I Master; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 LightCycler® 480 SYBR Green I Master H<sub>2</sub>O PCR grade; Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)  
 Methyl-4-hydroxybenzoat Nipagin™ (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>); Sigma (Deisenhofen, Deutschland)  
 β-Mercaptoethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS); Agilent-Technologies (Böblingen, Deutschland)  
 Natriumchlorid (NaCl); Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
 Natriumhydroxid (NaOH); Merck (Darmstadt, Deutschland)  
 Paraformaldehyd PFA ((CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>); Biochemika Fluka (Buchs, Schweiz)  
 Paraquat 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>); Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)  
 PBS Dulbecco (10x); Biochrom (Berlin, Deutschland)  
 Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S) 5000U; GIBCO-BRL (Eggenstein, Deutschland)

Polyoxylensorbitanmonolaurat Tween<sup>®</sup>-20 (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>); Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)  
 Propionsäure (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>); Sigma (Deisenhofen, Deutschland)  
 Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>); Serva GmbH (Heidelberg, Deutschland)  
 Triton X-100 (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>); Serva (Heidelberg, Deutschland)  
 Trypan Blue stain 0,4 %; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 Trypsin-EDTA (10x) 0,5 %/0,2 % in PBS; PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)  
 VLE RPMI 1640 Medium; Biochrom (Berlin, Deutschland)

### *Enzyme und Inhibitoren*

RNaseOUT<sup>™</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/μl]; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase [200 U/μl]; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 SecinH3 Zytosolin Inhibitor (C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S); Merck Millipore Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)  
 SP600125 JNK Inhibitor (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O); InvivoGen (San Diego, USA)

### *Kits*

ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA MiniTissue Kit; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)  
 LacZ Tissue Staining Kit; InvivoGen (San Diego, USA)  
 NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII; Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

## **3.1.5 Puffer, Stammlösungen und Medien**

Alle Puffer, Stammlösungen und Medien wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 20 min oder durch Sterilfiltrieren bei einer Porengröße von 0,22 μm.

### *Puffer und Stammlösungen*

Blockierungspuffer für Immunzytochemie: 10 % BSA (w/v) in PBS  
 Permeabilisierungspuffer für Immunzytochemie: 0,25 % Triton X-100 (v/v) in PBS  
 Stammlösung für Antikörperverdünnung: 1 % BSA (w/v) in PBS

### *Standardmedium zur Kultivierung von Drosophila melanogaster*

Die Kulturführung aller Stämme und Kreuzungen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, auf standardisiertem Vollmedium mit der folgenden Zusammensetzung:

20 g Glukose, 10 g Agar-Agar, 62,5 g Maismehl, 62,5 g Bierhefe, 30 g Zuckerrohrmelasse, 30 g Zuckerrübensirup, H<sub>2</sub>O *ad* 1000 ml

30 ml Nipagin™ (Methyl-4-hydroxybenzoat) (10 % w/v) in Ethanol (70 % v/v) und 10 ml Propionsäure (10 % v/v)

Das Flüssigstandardmedium für Langzeitstressversuche wies die gleiche Zusammensetzung auf, dabei wurde auf die Zugabe von Agar verzichtet.

Bezugsquelle von Maismehl, Hefe, Melasse und Zuckerrübensirup: Reformhaus Zündorf; Bad Segeberg

#### *Medium zur Kultivierung von A549-Zellen*

VLE RPMI 1640 Medium

10 % FCS (v/v)

1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) ( $\approx$ 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)

### **3.1.6 Antikörper**

#### *Primärantikörper*

Anti-FoxO1a Antikörper (rabbit polyclonal ChIP Grade); abcam (Cambridge, UK)

Anti-FoxO3a Antikörper (rabbit polyclonal); Thermo Sci./Pierce Biotech. (Rockford, USA)

Anti-FoxO4 Antikörper (rabbit polyclonal); abcam (Cambridge, UK)

#### *Sekundärantikörper*

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG; Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

### **3.1.7 Oligonukleotide**

Alle für die Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma life technologies™ Invitrogen™ synthetisiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in einer Stammkonzentration von 100 pmol/µl. Die Arbeitskonzentration in der *real-time* PCR betrug 10 pmol/µl.

Tab. 3.1: Oligonukleotide

Gen ID	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'→3')
	Oligo(dT) <sub>12</sub>	TTTTTTTTTTTTTT
	Oligo(dT) <sub>15</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTT
	Oligo(dT) <sub>18</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
<b>Antimikrobielle Peptid Gene</b>		
CG 10146	<i>attacinA_sense</i>	CACAATGTGGTGGGTCAGG
	<i>attacinA_antisense</i>	GGCACCATGACCAGCATT
CG 1373	<i>cecropinC_sense</i>	AAGATCTTCGTTTTCGTCGC
	<i>cecropinC_antisense</i>	GTTGCGCAATTCCCAGTC
CG 1385	<i>defensin_sense</i>	TTTTGCTCTGCTTGCTTGC
	<i>defensin_antisense</i>	ACATGATCCTCTGGAATTGGA
CG 12763	<i>diptericin_sense</i>	CGCAATCGCTTCTACTTTGG
	<i>diptericin_antisense</i>	TCCCTGAAGATTGAGTGGGTA
CG 10816	<i>drosocin_sense</i>	CCATCGAGGATCACCTGACT
	<i>drosocin_antisense</i>	CTTTAGGCGGGCAGAATG
CG 10810	<i>drosomycin_sense</i>	GAGGAGGGACGCTCCAGT
	<i>drosomycin_antisense</i>	TTAGCATCCTTCGCACCAG
CG 8175	<i>metchnikowin_sense</i>	TCTTGGAGCGATTTTTCTGG
	<i>metchnikowin_antisense</i>	TCTGCCAGCACTGATGTAGC
<b>Fettkörperspezifisches Gen</b>		
CG 3763	<i>fat body protein 2_sense</i>	TGCAAATGAACCTCATGGAA
	<i>fat body protein 2_antisense</i>	GGTTCCAGGCCATAGACAGA
<b>Hämozytenspezifisches Gen</b>		
CG 31770	<i>hemese_sense</i>	CCAAGTGAAACGGAATCCAC
	<i>hemese_antisense</i>	GAACCATAATGGCGTCGAAT
<b>Wnt-Signalweg</b>		
CG7926	<i>axin_sense</i>	CCGCGACAACATCTACCCCACG
	<i>axin_antisense</i>	CTTCCCGATCCCGTGGCGCCGC
CG11579	<i>armadillo_sense</i>	CAACGTTCTCGATAGCCAC
	<i>armadillo_antisense</i>	CGAATGAGTGCCCGGTTGTG
CG11793	<i>SOD<sup>(1)</sup>_sense</i>	CAAGGGCACGGTTTTCTTC
	<i>SOD_antisense</i>	CCTCACCGGAGACCTTCAC
CG8905	<i>mnSOD<sup>(2)</sup>_sense</i>	TGATCTTGAGGACATTATAAAACAAGA
	<i>mnSOD_antisense</i>	TCGGTAGGGTGTGCTTGC
CG6871	<i>catalase_sense</i>	TGACTACAAAACTCCCAAACG
	<i>catalase_antisense</i>	TTGATTCCAATGGGTGCTC
CG11086	<i>gadd45<sup>(3)</sup>_sense</i>	GATCCCTCTTCTGCCTGATG
	<i>gadd45_antisense</i>	CAGCAGTACCTCGTGCATGT

<b>JNK-Signalweg</b>		
CG7850	puckered_sense	GCCACATCAGAACATCAAGC
	puckered_antisense	CCGTTTTCCGTGCATCTT
CG 8678	ATG18.2 <sup>(4)</sup> _sense	AAAATACAATCACCAAGCACAAA
	ATG18.2_antisense	CAGCACGGACAGGGAAGT
<b>Keap1-Nrf2-Signalweg</b>		
CG4381	gstD3 <sup>(5)</sup> _sense	TTTACCACCGGTGAGTTTGG
	gstD3_antisense	AATCGAAAGTCTCCTGGACCT
<b>Homo sapiens Forkhead Box O Gene</b>		
2308	FoxO1a_sense	AAGGGTGACAGCAACAGCTC
	FoxO1a_antisense	TTCCTTCATTCTGCACACGA
2309	FoxO3a_sense	CTTCAAGGATAAGGGCGACA
	FoxO3a_antisense	CGACTATGCAGTGACAGGTTG
4303	FoxO4_sense	ACGAGTGGATGGTCCGTACT
	FoxO4_antisense	GTGGCGGATCGAGTTCTTC
100132074	FoxO6_sense	AAGGATAAAGGCGACAGCAA
	FoxO6_antisense	GTGTGCAGCGACAGGTTG
<b>Haushaltsgen Drosophila melanogaster</b>		
CG4651	rpl13 <sup>(6)</sup> _sense	CGTGGTTTCACCCTGGAG
	rpl13_antisense	TGGTCTTGCGGAAGTTGG
<b>Haushaltsgen Homo sapiens</b>		
267	$\beta$ -2-Mikroglobulin_sense	GCTGTGCTCGCGCTACTCTC
	$\beta$ -2-Mikroglobulin_antisense	GCGGCATCTTCAAACCTCCAT

<sup>(1)</sup> Superoxiddismutase, <sup>(2)</sup> Mangan-Superoxiddismutase, <sup>(3)</sup> growth arrest and DNA damage genes,

<sup>(4)</sup> autophagy-related gene 18.2, <sup>(5)</sup> Glutathion-S-transferase D3, <sup>(6)</sup> 60S ribosomales Protein L13

### 3.1.8 Drosophila-Stämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden verschiedene Fliegen-Stämme verwendet, welche in der folgenden Tabelle nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet sind.

**Tab. 3.2: Drosophila-Stämme**

Bezeichnung	Genotyp
<b>Wildtypstämme</b>	
Canton-S	w
w <sup>1118</sup>	w[1118]
<b>GFP-Reporterstämme</b>	
Drosomycin-GFP	yw (P(w-, drom-gfp)D4,P(ry+, dipt-lacZ) (162:7)2

Nrf2-GFP	GSTD-Gal4 UAS-GFP Quelle: Dirk Bohmann, University of Rochester Medical Center
STAT-GFP	w; 10xSTAT-GFP2nd Quelle: Erika A. Bach, New York University School of Medicine
<b>Treiberstämme</b>	
breathless-GAL4	w-, bfl, GAL4/CyO
ppk4-GAL4	yw67c23; ppk4-Gal4; +/+
ppk4-GAL4/tub-GAL80ts	w[*]; P{tubP-Gal80[ts]}2
puckered-GAL4	w[*]; P{GAL4E69}puc[GAL4E69]/TM3, Sb[1] Ser[1]
<b>Effektorstämme</b>	
UAS-FoxO	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS-foxo.P}2
UAS-FoxO <sup>TM</sup>	yw; UAS dFoxo <sup>TM</sup> M6-15/CyO
UAS-FoxO-GFP	Genotyp unbekannt Quelle: Tony Ip, University of Massachusetts Medical School
UAS-Dorsal-GFP	Genotyp unbekannt Quelle: Tony Ip, University of Massachusetts Medical School
UAS-Relish-GFP	Genotyp unbekannt Quelle: Tony Ip, University of Massachusetts Medical School
UAS-lacZ-nls	P{w[+mC]=UAS-lacZ.NZ}J312
<b>knock out und RNAi-Linien</b>	
FoxO-knock out	w[*]; P-foxo21/foxo21homozygot
Relish-knock out	w <sup>1118</sup> ; RelE38es

Wenn nicht anders vermerkt, ist die Quelle der verwendeten Stämme das Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana University

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Umgang mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

#### *Kulturführung von Drosophila melanogaster*

Alle für die Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Fliegen-Stämme und Kreuzungen wurden in 68 ml-Kulturröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium gehalten, die Zusammensetzung des Mediums ist unter Punkt 3.1.5 aufgeführt.

Mit Ausnahme der temperatursensitiven TARGET-Kreuzungen erfolgte die Kultivierung bei einer konstanten Temperatur von 21°C und 50-60 % relativer Luftfeuchte. Temperatursensitive TARGET-Kreuzungen wurden bei 17°C gehalten, die Aktivierung des Expressionssystems geschah bei 30°C.



Das Umsetzen adulter Tiere fand alle 14 Tage statt, dazu wurden Tiere durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in das Gefäß betäubt, 20-30 Imagos wurden entnommen und in neue Mediumröhrchen überführt.

### **Kreuzungen**

Für die Durchführung zahlreicher hier vorgestellter Versuche wurden Kreuzungen verschiedener transgener Fliegenstämme hergestellt. Die Kreuzungsansätze bestanden grundsätzlich aus mindestens zehn jungfräulichen Weibchen der Treiberlinie und drei bis fünf Tage alten Männchen der Effektorlinie. Bis zur Zusammenführung beider Linien wurden die Weibchen für drei Tage isoliert gehalten.

Die Eiablage sowie die Aufzucht der F1-Generation fand im *Drosophila*-Standardmedium statt. Unmittelbar nach der Eiablage wurde die Parentalgeneration in frisches Medium transferiert.

### **Stressversuche an *Drosophila melanogaster***

Zur Untersuchung stressinduzierter zellulärer Reaktionen wurden Stressoren gewählt, denen Organismen in ihrer Umwelt stets ausgesetzt sind. Zu den exogenen Stressoren zählen Schwankungen in der Temperatur, die über oder unter die physiologische Temperatur des Organismus steigen oder fallen. Gewählt wurden nicht-letale Temperaturen: 41°C als Hitzestress und 4°C als Kältestress. Der Hitze- und Kälteschock erfolgte im Medium, Larven wurden für 2 h auf einer Temperatur von 4°C bzw. für 30 min einer Temperatur von 41°C ausgesetzt. Im Anschluss an den Hitzeschock wurden die Tiere für weitere 90 min bei RT gehalten. Hunger-, UV- und oxidative Stressversuche machten es erforderlich, dass Larven ihrem Nährmedium entnommen wurden. Um eine Hungersituation zu simulieren, wurden Larven in PBS gewaschen und für 12 h in Petrischalen überführt, die mit PBS-angefeuchtetem Filterpapier ausgelegt waren. Oxidativer Stress wurde durch Einsatz von Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid) induziert. Dazu wurden Larven in flüssiges Standardmedium überführt, welches mit Paraquat in einer Konzentration von 100 mM versetzt war. Die Inkubation betrug je nach Versuch 1 h bis 24 h. Für Bestrahlungsexperimente wurden Larven für den Zeitraum der UV-Bestrahlung in PBS gehalten, die Irradiation erfolgte aus einer Distanz von 1 cm für die Dauer von 15 min bei einer Wellenlänge von 254 nm. Anschließend wurden die behandelten Larven für 105 min zurück in ihr Nährmedium überführt.

### **Präparation von Tracheen und Fettkörpern**

Für die Präparation von Tracheen und Fettkörpern wurden Larven im frühen L3-Stadium verwendet. Aus dem Medium entnommene Larven wurden in PBS gewaschen. Die Entnahme der Organe erfolgte in einem Blockschälchen in PBS unter dem Stereomikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung. Mit Hilfe zweier Feinpinzetten wurden das anteriore Ende der Larve, sowie der Darm und die Malpighischen Organe entfernt. Bei der Isolierung der Tracheen wurden die posterioren Stigmen freigelegt und die beiden Tracheenstränge samt Nebenästen aus dem Tier herausgezogen. Tracheen wurden vom adhärenenden Fremdgewebe wie Fettkörper und Hämozyten gesäubert und in PBS bzw. für eine anschließende RNA-Isolierung in 350 µl eisgekühltem Lysispuffer (RA1-Puffer, NucleoSpin RNAII, Macherey-Nagel) im 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Bei der Isolierung der Fettkörper wurde die Kutikula lateral aufgerissen und alle Organe sowie die Kutikula entfernt. Die Fettkörperlappen wurden in 350 µl eisgekühltem Lysispuffer gesammelt. Für die Herstellung eines biologischen Replikates wurden Tracheen aus 50 Tieren benötigt bzw. die Fettkörper aus 10 Tieren. Das Gewebe wurde mechanisch homogenisiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **3.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **Kulturführung von humanen Zelllinien**

Für Versuche mit humanen Epithelzellen wurde die Zelllinie A549 ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine humane adenokarzinome alveoläre Epithelzelllinie, welche 1972 durch D. J. Giard *et al.* etabliert wurde [106]. Diese Zellen sind adhären und bilden einen einschichtigen Rasen.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro 12 ml supplementiertes RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % P/S) bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % kultiviert. Das Umsetzen der A549-Zellen erfolgte alle sieben Tage. Um die Zellen vom Untergrund zu lösen, wurden sie in PBS gewaschen und anschließend für 4 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von supplementiertem Medium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 xg zentrifugiert, erneut in PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des automatischen Zellzählsystems Countess® der Firma Invitrogen unter Verwendung des Farbstoffes Trypanblau, welcher im Verhältnis 1:2 zur Zellsuspension hinzugefügt wurde. Dieses Verfahren ermöglicht eine genaue und selektive Zählung lebender Zellen.

### **Stressversuche an humanen A549-Zellen**

Zum Zwecke der Analyse einer stressinduzierten FoxO-Translokation war es notwendig A549-Zellen den gleichen Stressbedingungen auszusetzen, die bei Versuchen mit *Drosophila*-Larven angewendet wurden. Als Vorbereitung wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 400  $\mu$ l supplementiertes RPMI-Medium in die Kammern der 8-well  $\mu$ -slides der Firma ibidi ausgebracht und für 24 h bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % kultiviert. Dadurch sollte eine gleichmäßige Adhärenz gewährleistet und für alle Stressoren gleiche Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Da einige Stressbedingungen es erforderlich machen die Zellen für den Zeitraum der Stimulation in Abwesenheit von FCS zu kultivieren, wurden stets zwei Kontrollgruppen angelegt. Zellen der Kontrollgruppe 1 wurden im supplementierten RPMI-Vollmedium und Zellen der Gruppe 2 im RPMI-Medium ohne den Zusatz von FCS inkubiert. Beide Gruppen wurden unter optimalen Kulturbedingungen gehalten (37°C; 5 % CO<sub>2</sub>).

Die Induktion von oxidativem Stress in der Zellkultur erfolgte für 1 h (37°C; 5 % CO<sub>2</sub>) mit Paraquat, das in einer Endkonzentration von 20 mM im nicht-supplementierten RPMI-Medium gelöst wurde. Hitze- und Kältestress fanden im RPMI-Vollmedium jeweils für 1 h bei 41°C bzw. 4°C statt. Des Weiteren wurde die Bestrahlung mit UV-Licht ebenfalls im RPMI-Vollmedium vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen für 5 min UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aus einer Distanz von 1 cm ausgesetzt. Um für alle Stressversuche gleiche zeitliche Bedingungen zu schaffen, wurden UV-bestrahlte Zellen für weitere 45 min unter optimalen Kulturbedingungen inkubiert. Die Simulation eines Hunger-ähnlichen Zustandes in der Zellkultur, bestand darin alle Nährstoffe zu entziehen unter ansonsten unveränderten Rahmenbedingungen. Als einfache und bewährte Methode hat sich dafür die Inkubation in PBS erwiesen. Das Kulturmedium wurde für einen Zeitraum von 1 h (37°C; 5 % CO<sub>2</sub>) durch vorgewärmtes PBS ersetzt.

Im Anschluss an die Stressexposition wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.2.3.2 *Mikroskopieren von humanen Zellen* beschrieben, fixiert und für mikroskopische Analysen vorbereitet.

## **3.2.3 Mikroskopische Methoden**

### **3.2.3.1. Mikroskopieren von *Drosophila melanogaster***

Alle mikroskopischen Analysen kompletter *Drosophila*-Larven sowie isolierter Organe wurden unter Verwendung des SZX16 Fluoreszenz-Stereomikroskopes und der Objektive SDF Planapo 1xPF und SDF Planapo 2xPFC und der Fluoreszenzfilter SZX2-FUV und

SZX2-FGFP der Firma Olympus durchgeführt. Die photographische Dokumentation erfolgte unter Einsatz der DP72 Kamera und der *cellA software*.

### **GFP-Reporter**

Für die Visualisierung der Aktivität ausgewählter Gene und Lokalisation von Proteinen stehen in *Drosophila melanogaster* zahlreiche Methoden zur Verfügung, zwei davon werden im Folgenden vorgestellt.

Genexpression und Synthese von Zielproteinen werden seit Langem mit Hilfe des grün-fluoreszierenden Proteins GFP (*green fluorescent protein*) untersucht. Das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende biolumineszente Protein [107] ist im Gewebe leicht zu detektieren. Wird es mit kurzzeitigem Licht bestrahlt, emittiert es Wellen der Länge 509 nm, die als grünes Licht wahrgenommen werden. In der hier vorgestellten Arbeit fand das GFP Anwendung sowohl in Form von Fusionsproteinen als auch im Promotor-Reporter-System [108].

Zielproteine können durch die Fusion mit GFP visualisiert werden, was eine zeitliche und räumliche *in vivo* Lokalisation in einer Zelle erlaubt. In Kombination mit dem binären GAL4/UAS-Expressionssystem (Abschnitt 1.2.1) wurde diese Methode gewählt, um eine Migration der Proteine Dorsal, Relish und FoxO innerhalb der respiratorischen Epithelzelle zu untersuchen. Hierzu wurden UAS-FoxO-GFP-, UAS-Dorsal-GFP- und UAS-Relish-GFP-Effektorlinien mit der *breathless*-GAL4- oder *ppk4*-GAL4-Treiberlinie gekreuzt. F1-Nachkommen dieser Kreuzung synthetisieren das entsprechende GFP-Fusionsprotein. Bedingt durch die Wahl der Treiberlinie geschieht dies ausschließlich im Tracheenepithel. Larven dieser Kreuzung wurden im frühen L3-Entwicklungsstadium unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt, wie im Abschnitt 3.2.1 *Stressversuche an Drosophila melanogaster* beschrieben. Die mikroskopische *in vivo* Analyse erfolgte in PBS auf Eis. Des Weiteren wurden die Tracheen entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.1 *Präparation von Tracheen und Fettkörpern* isoliert und 20 min in 3 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit PBS erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 für 30 min, welcher in einer Konzentration von 30 µM in PBS gelöst wurde. Nach erneutem Waschen wurden die eingebetteten Tracheen mikroskopiert.

Anders als das soeben geschilderte Verfahren, das die Synthese und Lokalisation des Zielproteins direkt visualisiert, handelt es sich bei dem Promotor-Reporter-System um eine indirekte Analysemethode. Hierbei ist dem *gfp*-Gen eine Promotor- oder Enhancersequenz vorgeschaltet. Das kann die Promotorregion des Zielgenes selbst sein, wie im Falle der in dieser Arbeit verwendeten *Drosomycin*-GFP-Reporterlinie. Die Aktivität

des Promotors induziert die *gfp*-Expression, folglich signalisiert die GFP-Fluoreszenz eine Aktivität des *drosomycin*-Promotors.

Ferner erfolgte die Analyse der Keap1-Nrf2- und Jak/STAT-Signalweg-Aktivierung durch Zuhilfenahme zweier weiterer Promotor-Reporter-Linien [66],[152], der Nrf2-GFP- und STAT-GFP-Linie. Bei Nrf2 und STAT92E handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Um ihre Funktion als Transkriptionsfaktor erfüllen zu können, müssen diese Proteine an korrespondierende DNA-Sequenzen ihrer jeweiligen Zielgene binden. In der Nrf2-GFP- und STAT-GFP-Linie hat man sich diese Domänen der Zielgene zunutze gemacht um eine *gfp*-Expression zu induzieren. Auch in diesem Zusammenhang dient die GFP-Fluoreszenz als Marker für eine Nrf2- bzw. STAT92E-Aktivität. Im Genom der Nrf2-GFP-Reporterlinie wurde dem *gfp*-Gen die Nrf2-Bindedomäne des *gstD3*-Gens vorgeschaltet und die STAT-GFP-Reporterlinie verfügt über STAT92E-Bindesequenzen des *socs36E*-Gens.

Larven dieser Linien wurden für 24 h oxidativem Stress ausgesetzt. Dies erfolgte durch Beimischung von Paraquat ins Flüssigmedium in einer finalen Konzentration von 100 mM. Die auf diese Weise behandelten Larven sowie die Kontrolltiere wurden in PBS auf Eis betäubt und mikroskopisch analysiert oder zuvor präpariert.

### *lacZ/β-Galaktosidase-Reporter*

Das *lacZ*-Promotor-Reporter-System [1] basiert auf dem β-Galaktosidase-Gen *lacZ*, das seinen Ursprung im Bakterium *E. coli* hat. Inzwischen findet das *lacZ*-Gen Verwendung als Marker in zahlreichen Eukaryoten, dabei wird es unter den Einfluss eines geeigneten Promotors gestellt. In *Drosophila* macht man sich auch dabei die Vorteile des binären GAL4/UAS-Expressionssystems zunutze. In dieser Arbeit kam das *lacZ*-Promotor-Reporter-System zum Einsatz, um die Aktivität des JNK-Signalweges nachzuweisen. Dazu wurde eine Treiberlinie verwendet, in der das *gal4*-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des *puckered*-Promotors, eines JNK-Signalweg-regulierten Gens, steht. Diese wurde mit der *lacZ*-Effektorlinie gekreuzt, welche das *lacZ*-Gen beinhaltet, dem das UAS-Element vorgeschaltet ist. In Tieren der F1-Generation führt die Aktivität des *puckered*-Promotors zur Expression des für β-Galaktosidase kodierenden *lacZ*-Gens (Abschnitt 1.2.1). Entsprechend dem Verfahren der Blau-Weiß-Selektion von Bakterienkolonien kann die *lacZ*-Expression auch in mehrzelligen Eukaryoten mittels 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) visualisiert werden. Dabei hydrolysiert β-Galaktosidase die Substanz X-Gal zu Galaktose und einem blauen Farbstoff, der im Gewebe sichtbar wird. Der Nachweis der β-Galaktosidase- und somit der *puckered*-Promotor-Aktivität erfolgte unter Verwendung des *LacZ Tissue Staining Kit* der Firma InvivoGen. Verwendet wurden komplette Larven, die zuvor lateral geöffnet wurden. Die Durchführung der Färbung

erfolgte entsprechend der Vorgabe des Herstellers. Anschließend wurden die Organe separiert und unter Verwendung der Einbettungslösung *IMM ibidi mounting medium* auf einem Objektträger fixiert.

### 3.2.3.2. Mikroskopieren von humanen A549-Zellen

Alle mikroskopischen Analysen humaner A549-Zellen wurden unter Einsatz des *TCS Sp5 inverted confocal laser scanning microscope* und des 20x/0,70HC Plan Apochromat Öl-Objektives der Firma Leica vorgenommen. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der *Leica LAS AF Lite software*.

Als Vorbereitung für die mikroskopische Translokationsanalyse wurden Zellen in die Kammern der *8-well  $\mu$ -slides* der Firma ibidi ausgebracht und einer Stressestimulation unterzogen, wie im Abschnitt 3.2.2 *Stressversuche an humanen A549-Zellen* geschildert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, in den Kammern der *8-well  $\mu$ -slides* und bei RT.

Die am Boden der Kammern haftenden Zellen wurden 15 min mit 3 %-igem Paraformaldehyd fixiert, 5 min mit einer 0,25 %-igen Triton/PBS-Lösung permeabilisiert und anschließend 10 min mit einer 10 %-igen BSA/PBS-Lösung behandelt um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Nach jedem Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Die Bindung des Primärantikörpers fand bei 4°C für 12 h statt. Die Antikörper wurden in einer 1 %-igen BSA/PBS-Lösung in folgenden Mischungsverhältnissen verwendet:

Anti-FoxO1a-Antikörper (1:600); Anti-FoxO3a-Antikörper (1:150) und Anti-FoxO4-Antikörper (1:600). Die Reaktion mit dem Sekundärantikörper geschah für 45 min unter Ausschluss von Licht, wie auch alle nachfolgenden Schritte. Der Sekundärantikörper *Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG* wurde in einem Verhältnis von 1:300 in einer 10 %-igen BSA/PBS-Lösung eingesetzt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte für 20 min mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 in einer Konzentration von 3  $\mu$ M in PBS. Nach einem finalen Fixierungsschritt für 5 min mit 3 %-igem Paraformaldehyd, wurden die Zellen in PBS bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Quantifizierung der FoxO4-Aktivierung in Stressexponierten A549-Zellen erfolgte durch Auszählen.

### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.4.1. Isolierung von Nukleinsäuren

##### *DNA-Isolierung*

Die Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* Larven wurde mit Hilfe des ChargeSwitch® gDNA MiniTissue Kits der Firma Invitrogen vorgenommen und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### *RNA-Isolierung*

Die RNA-Isolierung, sowohl aus angereichertem Gewebe als auch aus kompletten Larven, wurde unter Verwendung des NucleoSpin RNAII Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Aus Tracheen wurde die RNA in einem Volumen von 40 µl dH<sub>2</sub>O, die RNA aus kompletten Larven und isolierten Fettkörpern in 60 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde in einer Verdünnung von 1:50 unter Verwendung des BioPhotometers der Firma Eppendorf ermittelt.

##### *cDNA-Synthese*

Die Synthese von cDNA erfolgt durch Reverse Transkription mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die Synthese der cDNA fand unter Verwendung der Reversen Transkriptase SuperScript™ III der Firma Invitrogen statt. Für die Reaktion wurden stets 500 ng RNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers in folgender Zusammensetzung:

**Tab. 3.3: Reaktionsansatz und Durchführung einer Reversen Transkription**

Reagenz	Volumen
RNA [500 ng]	x µl
dH <sub>2</sub> O	x µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> [50 µM]	1 µl
dNTP-Mix [10 mM each]	1 µl
→ 10 min/65°C → 5 min/auf Eis	
5x First Strand Buffer	4 µl
DTT [0,1 M]	1 µl
SuperScript™ III [200 U/µl]	1 µl
RNaseOUT™ [40 U/µl]	1 µl
→ 1 h/50°C → 15 min/70°C	



#### 3.2.4.2. *real-time* PCR

Die *real-time* PCR ist eine Fortentwicklung der herkömmlichen PCR-Technik und ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Messung der Produktmenge nach jedem Syntheszyklus. Die relative Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung der eingesetzten Detektionssubstanz. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ausschließlich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, der als einsatzfertige Mischung von der Firma Roche zur Verfügung gestellt wird. Dieser Farbstoff interkaliert unspezifisch mit doppelsträngiger DNA unter Bildung fluoreszierender Komplexe. Detektiert wird jedoch die Fluoreszenzabnahme zwischen einzelnen Zyklen, die durch Denaturierung der DNA-Doppelhelix und dem daraus resultierenden Zerfall des Komplexes entsteht.

Bei der relativen Quantifizierung in der *real-time* PCR wird die Expression eines Zielgens auf ein weiteres nicht-reguliertes Referenzgen bezogen, welches als *Normalizer* bezeichnet wird. Dieses wird benötigt um Konzentrationsschwankungen der eingesetzten cDNA auszugleichen. Zu diesem Zweck sind sogenannte Haushaltsgene am besten geeignet. Unter den in dieser Arbeit durchgeführten Bedingungen hatte sich das Gen der Ribosomenuntereinheit *rpl13* als optimal herausgestellt.

In frühen Zyklen der Reaktion findet eine exponentielle Vermehrung des Produktes statt, bis ein limitierender Faktor zu einem linearen Wachstum und schließlich zu einem Stillstand der Amplifikation zwingt. Als Schwellenwert wählt man die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt. Dieser Wert wird durch den *ct* (*cycle threshold*) oder auch *cp*-Wert (*crossing point*) angegeben, zu diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation exponentiell und somit quantifizierbar.

Das Ergebnis wird ins Verhältnis zu einem Kalibrator gesetzt, dessen Wert stets mit 1,0 angegeben wird. Dabei handelt es sich um eine Probe, bei der stets eine konstante Amplifikation des Zielgens zu erwarten ist, beispielsweise eine unbehandelte Kontrollprobe. Ein weiterer Vorteil der *real-time* PCR ist die Erstellung einer Schmelzkurve am Ende eines jeden Laufes, wodurch das amplifizierte Genprodukt identifiziert werden kann. Dabei macht man sich zunutze, dass jedes Amplikon durch seine unterschiedliche Länge und Basenkombination bei seiner ganz individuellen Temperatur in Einzelstränge zerfällt. Bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung auf 97°C wird die genaue Schmelztemperatur aller enthaltenen Genprodukte erfasst.

Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug 10 µl, die genaue Zusammensetzung, sowie der detaillierte Ablauf der Reaktion, der in dieser Arbeit durchgeführten *real-time* PCR, ist in den folgenden Tabellen aufgelistet.



Tab. 3.4: Zusammensetzung eines *real-time* PCR Reaktionsansatzes

Reagenz	Volumen
cDNA [12,5 ng/μl]	2 μl
dH <sub>2</sub> O	2,4 μl
SYBR Green I Master-Mix	5 μl
Oligonukleotid_ <i>sense</i> [10 pmol/μl]	0,3 μl
Oligonukleotid_ <i>antisense</i> [10 pmol/μl]	0,3 μl

Tab. 3.5: Reaktionsbedingungen einer *real-time* PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Anmerkungen
Präinkubation				
	95°C	10 min	1	
Amplifikation				
	95°C	10 sec	50	
	63°C	10 sec		
	72°C	10 sec		
	74°C	1 sec		Akquisitionsmodus: Einmalig
Schmelzkurve				
	95°C	10 sec	1	
	65°C	10 sec		
	97°C			Akquisitionsmodus: Kontinuierlich
Kühlen				
	40°C	30 sec	1	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Relevanz des Transkriptionsfaktors FoxO für die Entwicklung und Morphologie der larvalen Tracheen von *Drosophila*

Der Transkriptionsfaktor FoxO weist eine Vielfalt an Funktionen auf. Er ist an der Expression zahlreicher Gene beteiligt, die zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus, DNA-Reparatur und Energie-Homöostase regulieren [94] und ist somit von entscheidender Bedeutung für Zellwachstum und Proliferation. Demzufolge wurden zu Beginn dieser Arbeit die phänotypischen Auswirkungen untersucht, die eine vermehrte oder eine verminderte FoxO-Aktivität im ganzen Organismus und speziell in den Atemorganen der *Drosophila*-Larve verursacht.

Als Kontrolle für alle hier beschriebenen Versuche diente die Wildtyplinie w<sup>1118</sup>. Wildtyp-Larven wurden identischen Bedingungen ausgesetzt wie Larven der transgenen Linien.

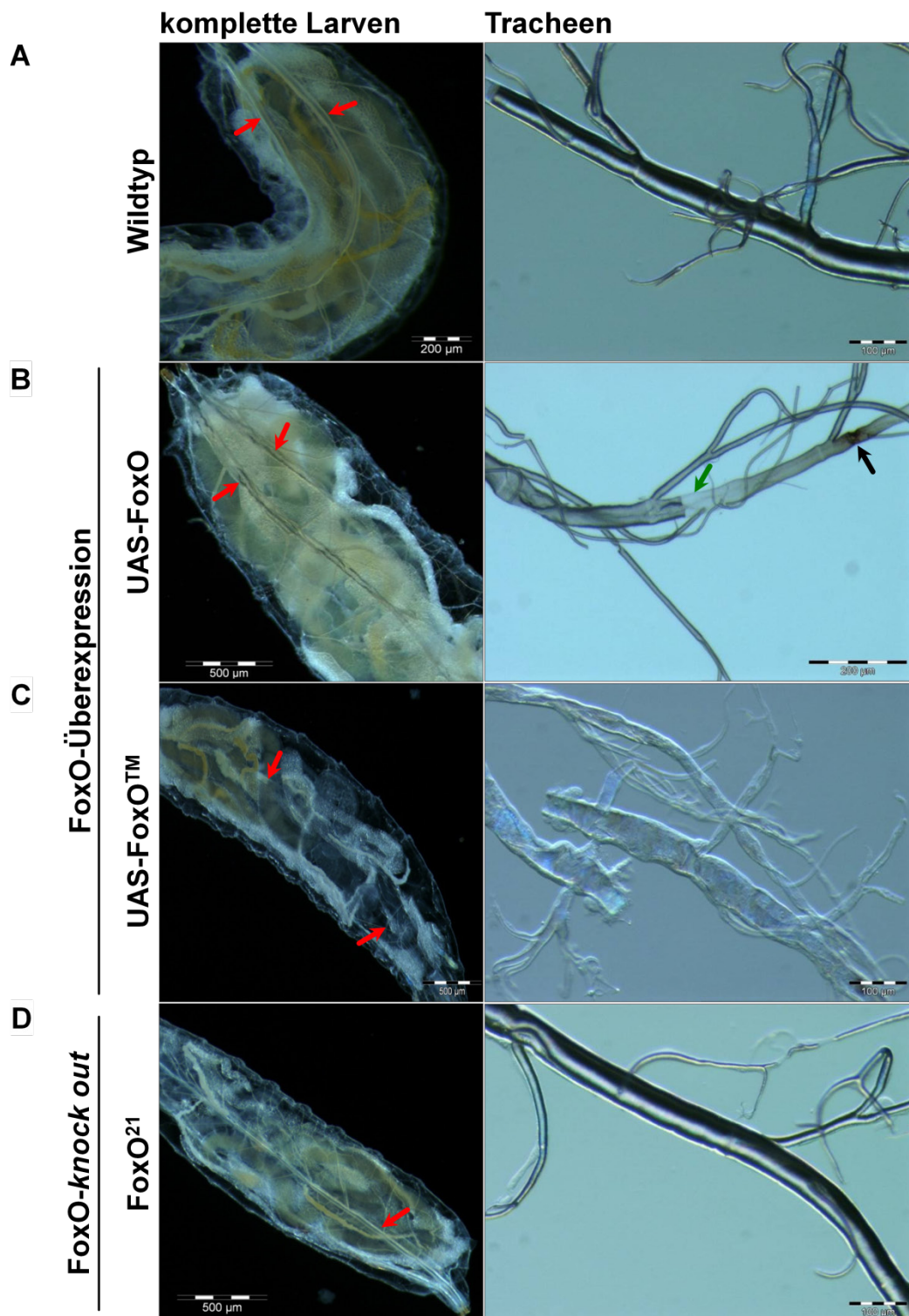
Um eine Erhöhung der FoxO-Aktivität im ganzen Tier zu induzieren, wurde das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem und für eine Tracheen-spezifische Expression das TARGET-System eingesetzt (Abschnitt 1.2.1). In beiden Fällen fanden zwei unterschiedliche FoxO-Effektorlinien Verwendung: UAS-FoxO dirigiert die konventionelle Überexpression des *foxO*-Gens und UAS-FoxO<sup>TM</sup> die Expression des konstitutiv aktiven FoxO.

Zunächst wurde eine Überexpression sowohl von FoxO als auch von FoxO<sup>TM</sup> im gesamten Organismus durch Kreuzung mit der Treiberlinie tub-GAL4 induziert. In den Nachkommen dieser Kreuzung wurde die Expression durch die transkriptionelle Aktivität des *tubulin*-Promotors hervorgerufen. Nach der Ablage einer normalen Anzahl phänotypisch unveränderter Eier, entwickelten sich aus diesen jedoch keine Larven. Dies führt zu dem Schluss, dass eine generelle Erhöhung der *foxO*-Expression im Verlauf der Embryonalentwicklung letal ist.

Anschließend wurde eine FoxO- und FoxO<sup>TM</sup>-Expression in larvalen Tracheen induziert.

Bei der Betrachtung der dorsalen Seite einer Wildtyp-Larve (Abb. 4.1 A) waren gesunde und funktionelle Tracheen als weiße oder silbrig-glänzende, gleichmäßig geformte, röhrenförmige Stränge zu erkennen, die die Larve vom anterioren zum posterioren Ende durchziehen (Abb. 4.1 A - rote Pfeile). Isolierte Tracheen wiesen, bedingt durch ihr luftgefülltes Lumen, eine dunkle Färbung mit einer ebenmäßigen Epithelschicht auf, die als weißer Saum entlang des Tracheenrandes sichtbar war.

Eine Tracheen-spezifische *foxO*-Expression (UAS-FoxO) wurde durch Kreuzung mit der Treiberlinie ppk4-GAL4/tub-GAL80ts induziert (ppk4-GAL4/tub-GAL80ts::UAS-FoxO).



**Abb. 4.1: Phänotypische Auswirkungen einer erhöhten und verminderten FoxO-Aktivität in larvalen Tracheen**

Als Kontrolle diente die Wildtyp-Linie  $w^{1118}$  (A). Für eine vermehrte FoxO-Aktivität wurden UAS-FoxO- und UAS-FoxO<sup>TM</sup>-Linien mit dem Tracheen-spezifischen Treiber  $ppk4\text{-}GAL4/tub\text{-}GAL80ts$  gekreuzt (B und C). Die FoxO-Expression wurde im frühen 2. Larvenstadium für 24 h bei 30°C induziert (B). Die FoxO<sup>TM</sup>-Expression wurde nicht induziert. Die Abbildung zeigt Larven, die bei einer permissiven Temperatur (17°C) gehalten wurden (C). Die verminderte FoxO-Aktivität wurde in FoxO-knock out-Tieren untersucht (FoxO<sup>21</sup>) (D). Die roten Pfeile weisen auf die Position der Tracheen in der *Drosophila*-Larve. Melanisierung des Epithelgewebes ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet und Flüssigkeitsinfiltration mit einem grünen Pfeil.

Die Larven der F1-Generation wurden bei 17°C gehalten, im 2. Larvenstadium wurde die *foxO*-Expression durch eine Temperaturerhöhung auf 30°C für 24 h induziert (Abb. 4.1 B). Während der Induktionsphase (30°C) verließen Larven das Medium und sammelten sich auf der Mediumoberfläche. Im Verlauf der Induktion sowie im Anschluss daran konnten keine entwicklungsbiologischen Veränderungen festgestellt werden. Die Dauer bis zur Verpuppung sowie der Metamorphose unterschied sich nicht von der der Wildtyplinie. Im Anschluss an die 24-stündige Induktion der *foxO*-Expression im Tracheenepithel wurden phänotypische Veränderungen der Larven dokumentiert. Tracheen dieser Larven wiesen dunkle, längs der primären Tracheenstränge verlaufende Linien, sowie Verformungen ihrer Struktur auf, die auf Veränderungen des Chitingerüsts zurückzuführen sind (Abb. 4.1 B - rote Pfeile). Die Betrachtung isolierter Tracheen bestätigte die Strukturveränderungen und offenbarte des Weiteren partielle Flüssigkeitsinfiltrationen (Abb. 4.1 B - grüner Pfeil) und melanierte Areale (Abb. 4.1 B - schwarzer Pfeil).

Die konstitutive FoxO-Aktivierung in larvalen Tracheen erfolgte ebenfalls durch Kreuzung mit der Treiberlinie *ppk4-GAL4/tub-GAL80ts* (*ppk4-GAL4/tub-GAL80ts::UAS-FoxO<sup>TM</sup>*). Die Larven der F1-Generation wurden bei 17°C gehalten. Bereits bei der permissiven Temperatur (17°C) hatte die konstitutive FoxO-Aktivität im Tracheenepithel, bedingt durch die Undichtigkeit des TARGET-Systems, letale Folgen. Die Entwicklung der Larven verlief im Vergleich zum Wildtyp verzögert und nur bei einem geringen Prozentsatz der Eier erfolgte ein erfolgreiches Schlüpfen. Diese Larven sammelten sich an der Gefäßwand und starben noch im L1-Stadium. Die dorsale Ansicht der L1-Larven ließ massive Tracheenschäden erkennen. Sowohl die primären als auch sekundären Tracheenäste dieser Tiere waren transparent und folglich vollständig flüssigkeitsgefüllt, nur vereinzelte tertiäre Verzweigungen im anterioren Teil der Larve waren funktionell (Abb. 4.1 C - rote Pfeile). Bei der Isolierung der Tracheen trat ihre hochgradige Fragilität zutage, was sowohl auf den Verlust der Elastizität als auch eine verdickte und unregelmäßige Epithelschicht zurückzuführen ist (Abb. 4.1 C).

Die Analyse der verminderten FoxO-Aktivität erfolgte in *FoxO-knock out*-Tieren (Abb. 4.1 D). In diesen befindet sich, infolge eines Basenaustausches in der Forkhead-Domäne des *foxO*-Gens, anstatt eines Tryptophan- ein Stop-Kodon, wodurch die Translation an Position 95 des Proteins stoppt [109]. Die Larven der im Folgenden als *FoxO<sup>21</sup>* bezeichneten *Drosophila*-Linie, obwohl unfähig ein funktionierendes FoxO-Protein zu synthetisieren, waren uneingeschränkt lebensfähig, von normaler Größe und unterschieden sich weder in ihrer phänotypischen Erscheinung noch in ihrer Entwicklung von Wildtyp-Tieren (Abb. 4.1 D). Sowohl bei der *in vivo*-Analyse der Larven als auch bei der Betrachtung isolierter Tracheen, wiesen die Organe alle Eigenschaften funktioneller und gesunder Tracheen auf. Auch physiologisch konnten unter optimalen Bedingungen

keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass der Transkriptionsfaktor FoxO für eine normale Entwicklung nicht erforderlich ist. Hingegen induzierte eine verstärkte FoxO-Expression und eine konstitutive Aktivierung von FoxO in den Atemwegen der *Drosophila*-Larve Prozesse, die sich in morphologischen und funktionellen Veränderungen des Organs manifestieren.

## 4.2 Regulierung der FoxO-Aktivität durch Stress

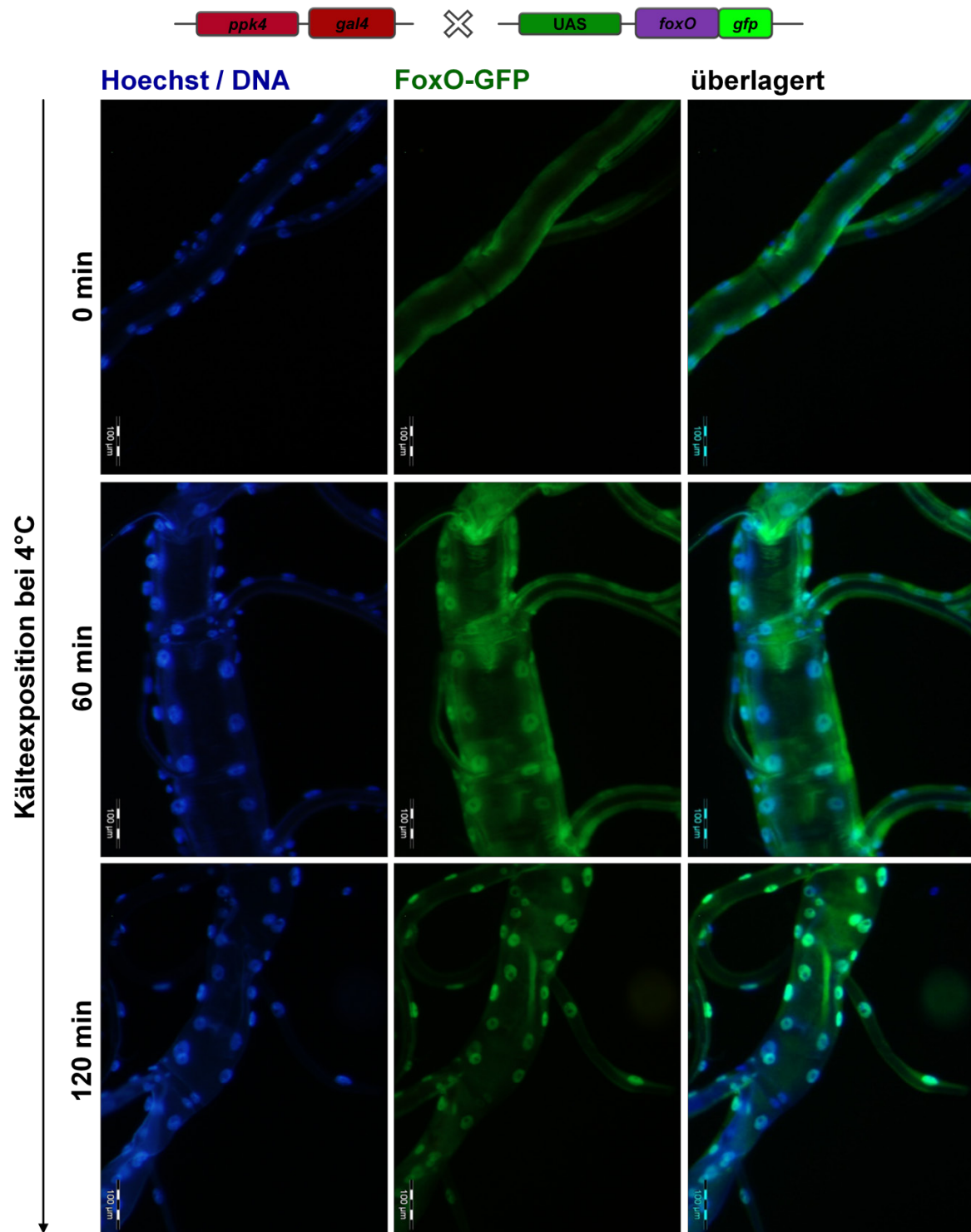
Der Begriff Stress bezeichnet einen belastenden Zustand für eine Zelle oder einen Organismus, der physiologische Veränderungen verursacht, auf die der Organismus reagieren muss um den Folgen entgegenzuwirken und ein Überleben zu sichern. Ursachen solcher physiologischer Veränderungen können vielfältig sein und umfassen Infektion, Verletzungen und die Bandbreite an Umweltstressoren (Kapitel 1.4).

Die Rolle von FoxO bei der Antwort auf oxidativen Stress ist Inhalt aktueller Forschung und wurde in den Abschnitten 1.3.2 und 1.4.1 vorgestellt [100],[109],[110]. Der folgende Teil dieser Arbeit widmete sich der Beantwortung der Frage, ob FoxO als zentraler Mediator der Stressantwort fungiert. Zu diesem Zwecke wurden, neben oxidativem Stress, unterschiedliche Faktoren gewählt, die eine Stresssituation simulieren: variierende Temperaturbedingungen, die oberhalb (40°C) und unterhalb (4°C) des physiologischen Bereichs der Taufliede liegen, UV-Strahlung und Ernährungsstress in Form eines Nährstoffentzuges (Hunger).

### 4.2.1 Stressinduzierte FoxO-Aktivierung im respiratorischen Epithel von *Drosophila*-Larven

Proteine, die die Funktion von Transkriptionsfaktoren erfüllen, haben die Aufgabe eine Genexpression zu initialisieren. Zu diesem Zwecke binden Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Sequenzen ihrer Zielgene, weshalb es erforderlich ist, dass sie in den Kern einer Zelle transportiert werden. Der Übertritt aus dem Zytoplasma in das Innere des Zellkerns wird als nukleäre Translokation bezeichnet und kann insbesondere im Fall der Transkriptionsfaktoren mit einer Aktivierung derselben gleichgesetzt werden. Unter Einsatz des binären GAL4/UAS-Expressionssystems und der Treiberlinien *ppk4*-GAL4 und *breathless*-GAL4 wurden *Drosophila*-Linien generiert, in denen die Expression der Transkriptionsfaktor-GFP-Fusionsproteine (FoxO-, Dorsal- oder Relish-GFP) unter der transkriptionellen Kontrolle des Tracheen-spezifischen Promotors (*ppk4* oder *breathless*) steht. Im Atemwegsepithel dieser Tiere kann das Zielprotein infolge der GFP-Fluoreszenz *in vivo* visualisiert und lokalisiert werden.





**Abb. 4.2: FoxO-Translokation infolge einer Kälteeexposition**

Lokalisation des Transkriptionsfaktors FoxO in Epithelzellen larvaler Tracheen im Verlauf einer Kälteeexposition. Um ein einheitliches System zur Analyse einer stressinduzierten nukleären FoxO Translokation zu etablieren, wurden Larven der Linie *ppk4-GAL4::UAS-FoxO-GFP* einer Temperatur von 4°C ausgesetzt. Vor Beginn der Kälteeexposition, nach 60 min und nach 120 min wurden Tracheen präpariert und mikroskopisch analysiert. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechst 33342.

Larven, deren respiratorische Epithelzellen ein Dorsal-GFP- bzw. ein Relish-GFP-Fusionsprotein transkribierten, wurden als Indikatoren für die potentielle Aktivität des Toll- bzw. des IMD-Signalweges verwendet. Von der Analyse des dritten NF-κB-Faktors DIF

wurde abgesehen. Obwohl dieser in gleicher Weise wie Dorsal seine Aktivierung durch den Toll-Signalweg erfährt, liegt seine Hauptfunktion jedoch im adulten Tier. Eine dritte Reporterlinie diente der Analyse der Aktivität des Transkriptionsfaktors FoxO.

Um zunächst die Rahmenbedingungen der Versuchsreihe zu etablieren, war es erforderlich, die Geschwindigkeit, mit der eine stressinduzierte Translokation in Epithelzellen der *Drosophila*-Larve vonstattengeht, festzustellen. Hierzu wurden Larven der Linie FoxO-GFP (ppk4-GAL4::UAS-FoxO-GFP) einem Kältestress ausgesetzt (4°C). In konstanten Zeitintervallen wurden Tracheen isoliert und mikroskopisch untersucht. In Tracheen unbehandelter Larven (Abb. 4.2 - 0 min) wurde eine gleichmäßige Verteilung der GFP-Fluoreszenz in der gesamten Epithelschicht detektiert. Die zytoplasmatische FoxO-Lokalisation signalisiert eine Inaktivität des Proteins unter Normalbedingungen.

Bereits nach 60 min konnte eine beginnende Akkumulation des GFP-Signals in den Kernen des Tracheen-Epithels beobachtet werden (Abb. 4.2 - 60 min). Eine Färbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 ermöglichte die Visualisierung und Lokalisierung der Zellkerne. Die Überlagerung des Hoechst-Signals mit dem GFP-Signal verifizierte eine nukleäre Translokation des Foxo-GFP-Fusionsproteins infolge einer Stressexposition. Eine maximale Translokation wurde nach 120 min detektiert (Abb. 4.2 - 120 min). Deshalb wurde für alle weiteren untersuchten Stressoren, mit Ausnahme von Hunger, ein Zeitraum von 2 h zwischen Stressinduktion und Detektion des Signals festgelegt. In entsprechenden Voruntersuchungen wurde Hungerstress analysiert und eine 12-stündige Stressdauer für adäquat befunden.

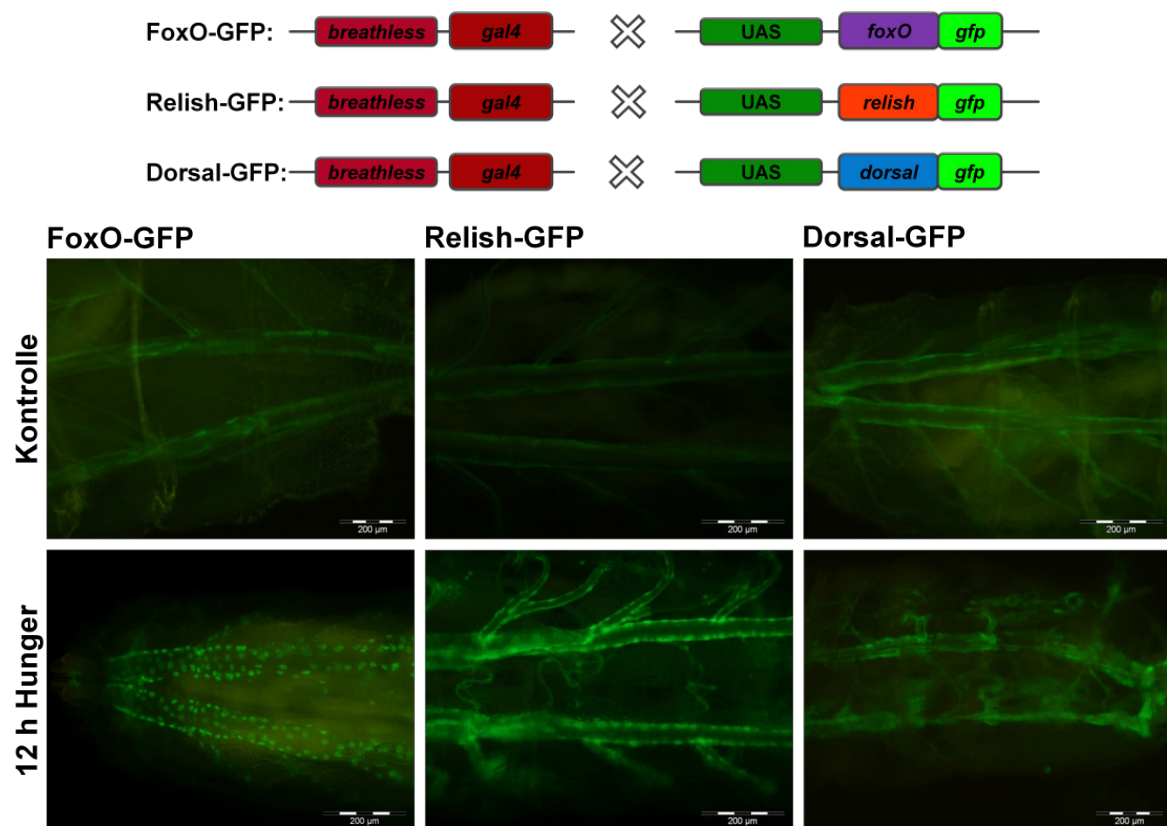
Wie bereits erwähnt wurden neben FoxO auch die stressregulierte Lokalisation der NF-κB-Transkriptionsfaktoren Dorsal und Relish in Epithelzellen betrachtet.

Für *in vivo*-Analysen hat sich der *breathless*-GAL4-Treiber, der eine starke konstitutive Expression der Fusionsproteine (FoxO-GFP, Relish-GFP und Dorsal-GFP) in larvalen Tracheen dirigiert, als optimal erwiesen.

Vor Beginn der Stressexposition wurden die Larven mikroskopisch untersucht. Bei allen Larven wiesen die Fusionsproteine eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung in den Epithelzellen der Tracheen auf (Abb. 4.3 - 4.7).

Um Hungerstress zu simulieren, wurden Larven für 12 h auf PBS-getränktem Filterpapier ohne Zugang zu Nahrung gehalten. Bereits nach 6 h konnte eine beginnende FoxO-Translokation beobachtet werden. Nach 12 h ohne Nahrung, wiesen alle Larven eine Konzentration des FoxO-Proteins in den Kernen ihrer Atemwegsepithelzellen auf (Abb. 4.3). In 50 % der untersuchten Larven war nach einer 12-stündigen Hungerphase eine Translokation des Transkriptionsfaktors Relish zu beobachten. Anders als bei FoxO war in den primären Tracheensträngen die Translokation schwach, in sekundären Tracheenästen hatte jedoch eine vollständige nukleäre Relish-Akkumulation

stattgefunden. Eine Migration von Dorsal aus dem Zytoplasma in den Kern infolge von Hunger fand zu keinem Zeitpunkt statt (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO, Relish und Dorsal im larvalen Atemwegsepithel nach einer 12-stündigen Hungerphase**

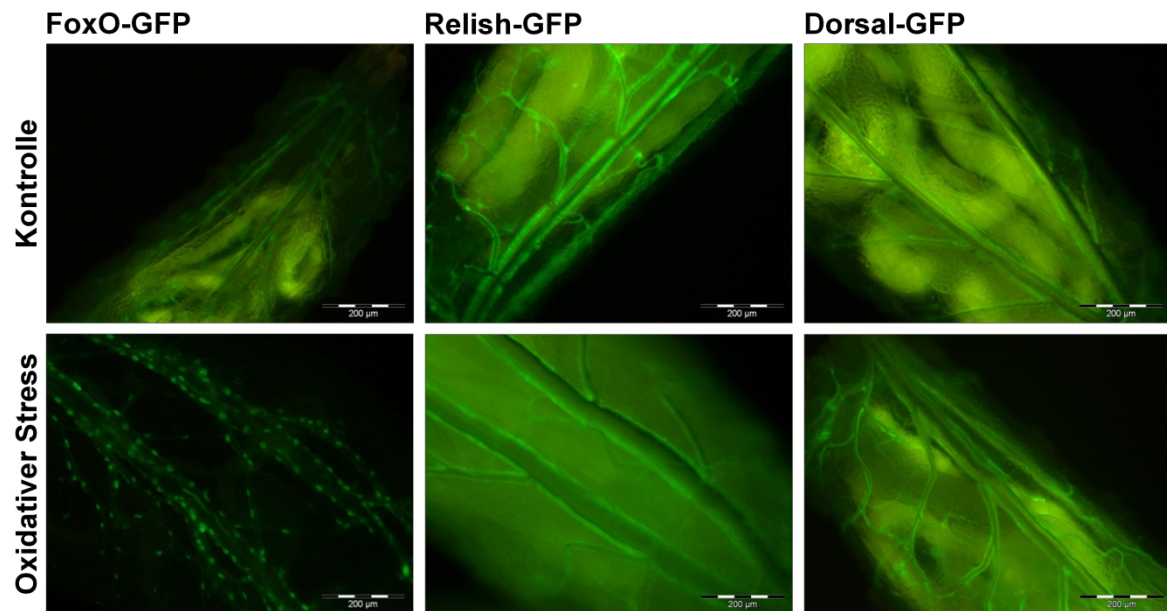
Dorsale Ansicht transgener Larven der Linie *breathless*-GAL4::UAS-FoxO-GFP, *breathless*-GAL4::UAS-Relish-GFP und *breathless*-GAL4::UAS-Dorsal-GFP. L2-Larven wurden für 12 h unter Nahrungsentzug gehalten, Kontrolltiere wurden für den gleichen Zeitraum unter optimalen Ernährungsbedingungen kultiviert. Hunger induzierte eine nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren FoxO und Relish aber nicht Dorsal. Dargestellt sind jeweils repräsentative Beispiele (n=25 Larven).

Als weitere Stressoren wurden oxidativer Stress, UV-Strahlung sowie Kälte- und Hitzeexposition gewählt. In allen Fällen erfolgte die mikroskopische Detektion 2 h nach Beginn des Stress-Inputs. Oxidativer Stress, der als die Anreicherung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in der Zelle definiert ist (Kapitel 1.4.1), wurde durch Beimischung der ROS-generierenden Substanz Paraquat ins Medium hervorgerufen. Dadurch war neben einer kutikulären zusätzlich eine orale Aufnahme des Stressors gewährleistet (Abb. 4.4).

Um Larven mit UV-Licht bestrahlen zu können, war es erforderlich, sie für den Zeitraum der UV-Exposition dem Medium zu entnehmen. In vorangegangenen kinetischen Untersuchungen erwies sich eine 15 minütige Bestrahlung (254 nm) als angemessen. (Abb. 4.5). Kälte- und Hitzestress erfolgten für 2 h bei 4°C bzw. für 30 min bei 41°C im Medium (Abb. 4.6 und 4.7). Jeder der genannten Stressoren induzierte innerhalb von 2 h eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO in Epithelzellen larvaler Tracheen,

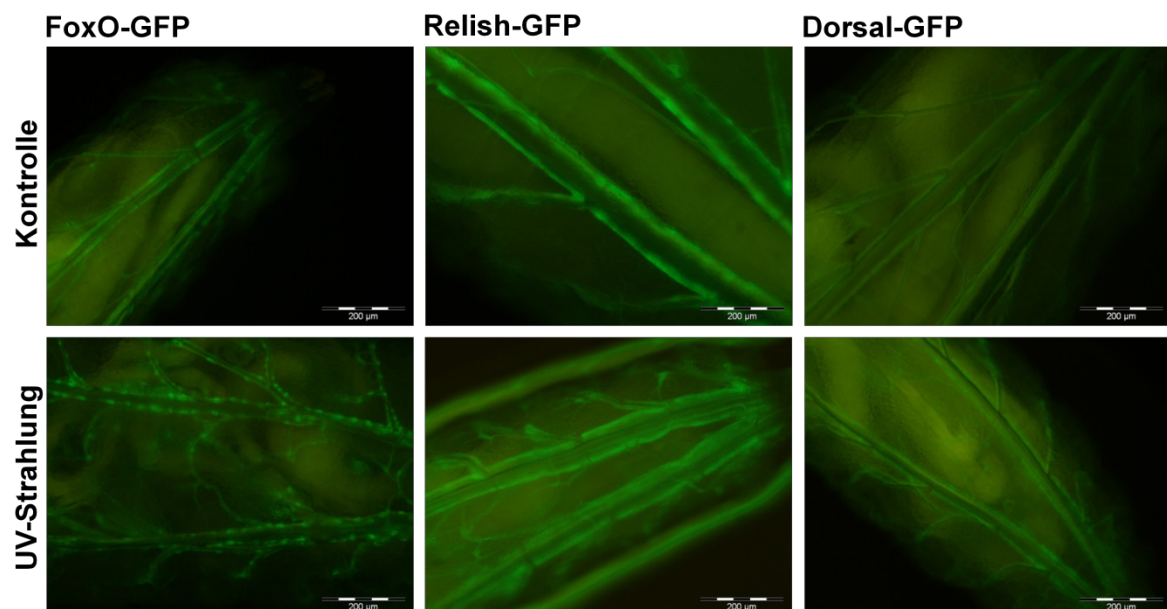


visualisiert durch die Akkumulation des GFP-Signals im Zellkern. Eine nukleäre Translokation von Relish und Dorsal konnte in keinem Fall detektiert werden (Abb. 4.4 - 4.7).



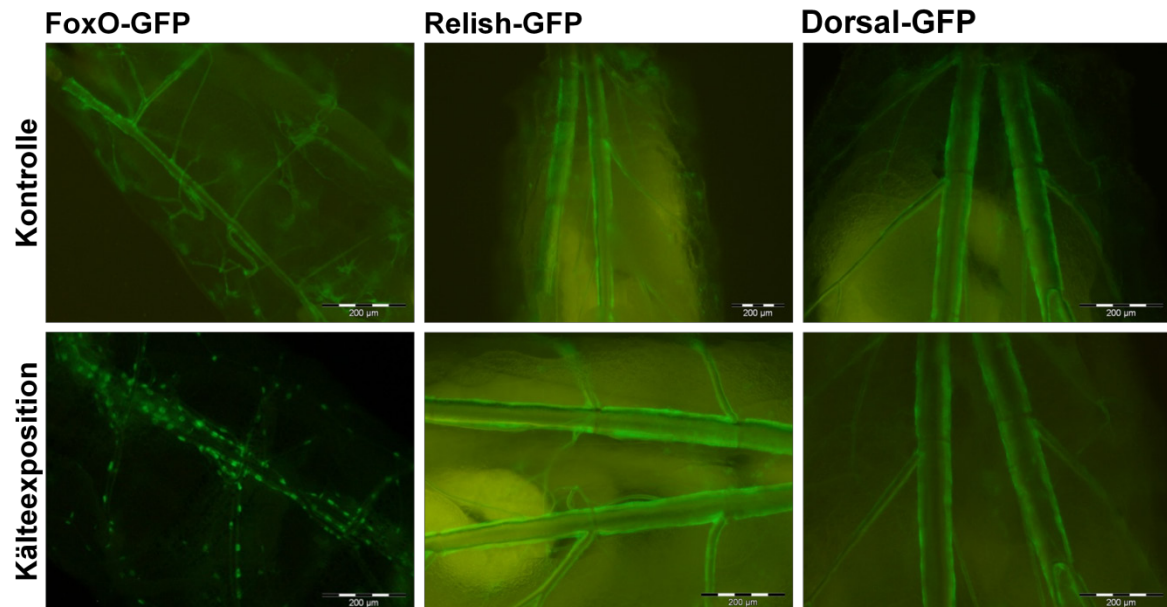
**Abb. 4.4: Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO, Relish und Dorsal im larvalen Atemwegsepithel nach oxidativem Stress**

Dorsale Ansicht transgener Larven der Linie *breathless-GAL4::UAS-FoxO-GFP*, *breathless-GAL4::UAS-Relish-GFP* und *breathless-GAL4::UAS-Dorsal-GFP*. L2-Larven wurden für 2 h oxidativem Stress ausgesetzt, der durch die ROS-generierende Substanz Paraquat [100 mM] induziert wurde. Oxidativer Stress induziert eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors FoxO, weder Relish noch Dorsal zeigten eine Aktivierung. Dargestellt sind jeweils repräsentative Beispiele (n=25 Larven).



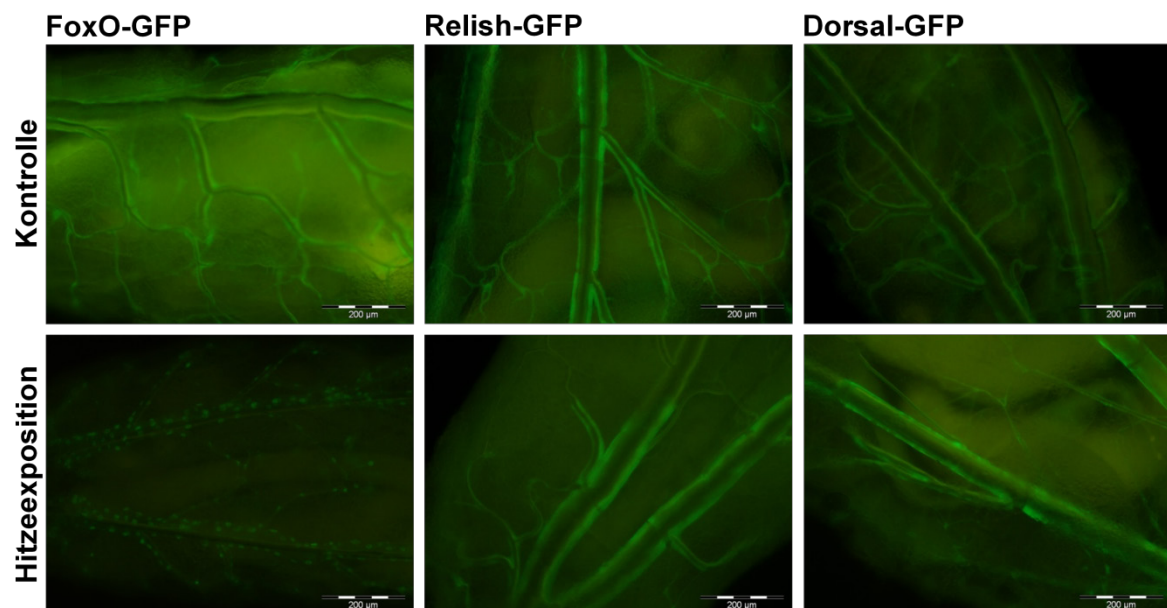
**Abb. 4.5: Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO, Relish und Dorsal im larvalen Atemwegsepithel nach UV-Exposition**

Dorsale Ansicht transgener Larven der Linie *breathless-GAL4::UAS-FoxO-GFP*, *breathless-GAL4::UAS-Relish-GFP* und *breathless-GAL4::UAS-Dorsal-GFP*. L2-Larven wurden für 15 min UV-Strahlung der Wellenlänge 254 nm ausgesetzt. Zwei Stunden nach Stressinduktion wurde eine FoxO-Aktivierung im Tracheenepithel detektiert. Die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Relish und Dorsal wurden durch UV-Strahlung nicht aktiviert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Beispiele (n=25 Larven).



**Abb. 4.6: Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO, Relish und Dorsal im larvalen Atemwegsepithel nach Kälteeexposition**

Dorsale Ansicht transgener Larven der Linie *breathless-GAL4::UAS-FoxO-GFP*, *breathless-GAL4::UAS-Relish-GFP* und *breathless-GAL4::UAS-Dorsal-GFP*. L2-Larven wurden für 2 h einer Temperatur von 4°C ausgesetzt. Larven reagierten mit einer nukleären FoxO-Translokation im Atemwegsepithel. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Relish und Dorsal wurde durch Kälte nicht ausgelöst. Dargestellt sind jeweils repräsentative Beispiele (n=25 Larven).



**Abb. 4.7: Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO, Relish und Dorsal im larvalen Atemwegsepithel nach Hitzeexposition**

Dorsale Ansicht transgener Larven der Linie *breathless-GAL4::UAS-FoxO-GFP*, *breathless-GAL4::UAS-Relish-GFP* und *breathless-GAL4::UAS-Dorsal-GFP*. L2-Larven wurden für 30 min einer Temperatur von 41°C ausgesetzt. Zwei Stunden nach Induktion des Hitzestresses zeigten Larven eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors FoxO in den Kernen der respiratorischen Epithelzellen. Eine Hitzestress-induzierte Aktivierung von Relish und Dorsal konnte nicht detektiert werden. Dargestellt sind jeweils repräsentative Beispiele (n=25 Larven).

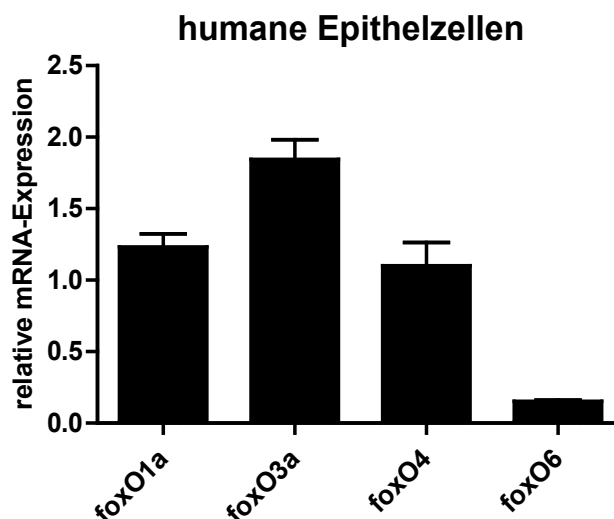
In Epithelzellen der respiratorischen Organe von *Drosophila*-Larven konnte somit der Transkriptionsfaktor FoxO als ein zentraler Mediator von Stress identifiziert werden. Es

konnte gezeigt werden, dass FoxO infolge der Exposition unterschiedlicher Stress-Situationen (Hunger, oxidativer, ionisierender sowie Temperaturstress) aktiviert wird, was durch eine nukleäre Translokation des Proteins verifiziert wurde.

#### 4.2.2 Stressinduzierte FoxO-Aktivierung in humanen alveolären Epithelzellen

Bei FoxO handelt es sich um ein evolutionär sehr ursprüngliches Protein, das nachweislich in annähernd allen Tierklassen von Nematoden über Cnidaria, Insekten und Säuger in ihrer Aminosäuresequenz hochkonserviert vorliegt [111] (Kapitel 1.5.1). Basierend auf der Erkenntnis, dass der Transkriptionsfaktor als unspezifisch aktivierbarer Stressmediator in Epithelzellen des Modellorganismus *Drosophila* dient, stellte sich die Frage, ob FoxO in dieser Funktion im Menschen konserviert geblieben ist. Im Gegensatz zu *Drosophila* verfügt das menschliche Genom über vier *foxO*-Gene, die funktionelle Proteine kodieren, für die eine Variation unterschiedlicher Funktionen und Gewebspräferenzen postuliert wird [104].

Zur Überprüfung einer stressinduzierten Aktivierung der humanen FoxO-Proteine wurde die humane alveoläre Epithelzelllinie A549 ausgewählt, die in ihrer Physiologie und Funktion dem *Drosophila*-Tracheenepithel als äquivalent anzusehen ist. Zunächst wurde die Expression der vier humanen *foxO1a*-, *foxO3a*-, *foxO4*- und *foxO6*-Gene in A549-Zellen überprüft (Abb. 4.8).



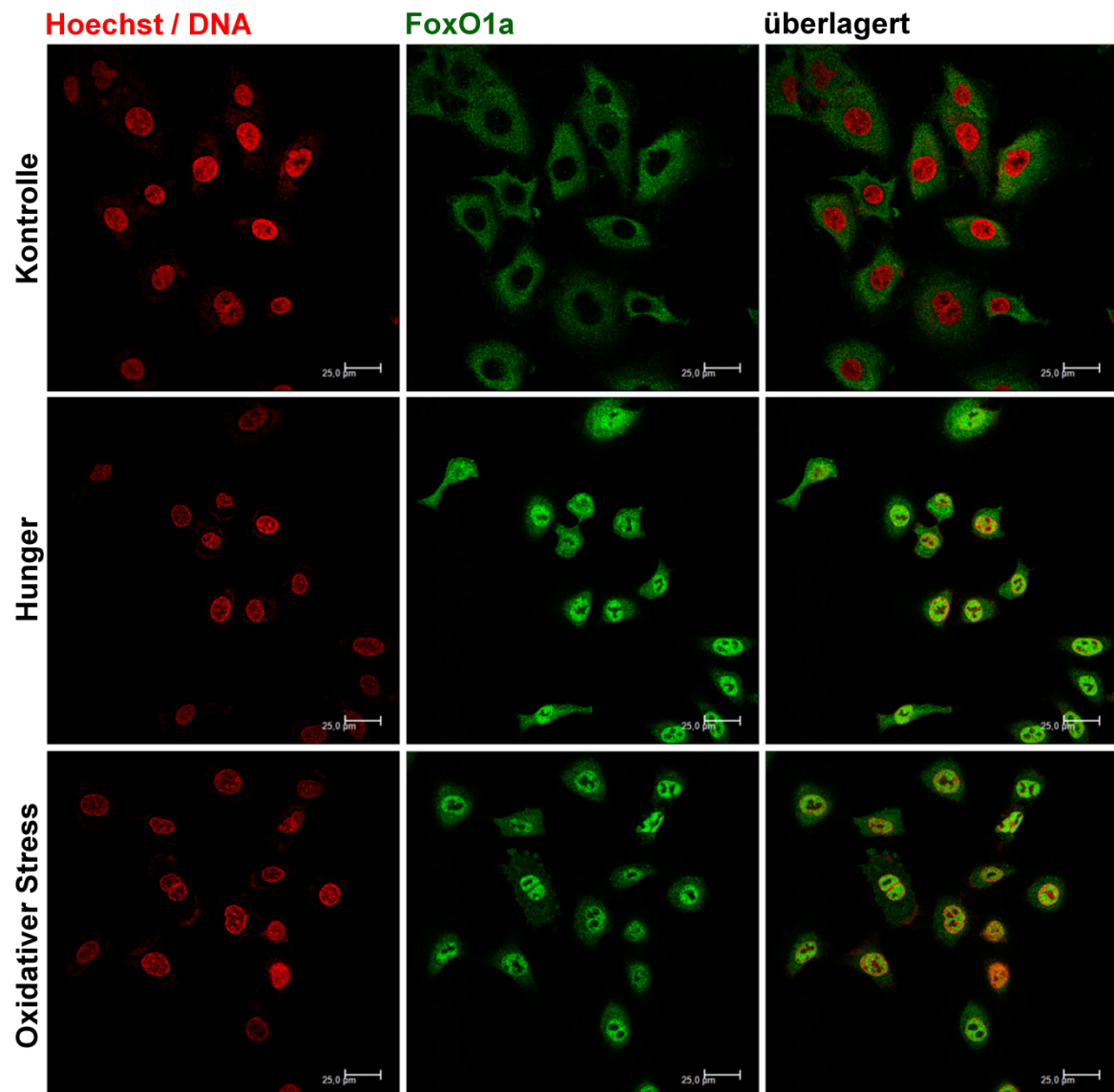
**Abb. 4.8: Expression humaner FoxO-Gene in alveolären Epithelzellen der Linie A549**

In einer *real-time* PCR wurde die Expression der humanen FoxO-Gene in Zellen der Linie A549 ermittelt. Dargestellt ist die relative *foxO*-Expression in Relation zum Haushaltsgen  $\beta$ -2-mikroglobulin einer exemplarischen Messung; Mittelwert zweier technischer Replikate  $\pm$  SD.

Die Expression aller vier humaner *foxO*-Gene konnte in der A549-Epithelzelllinie bestätigt werden. Die ermittelten Expressionsniveaus der Gene variierten erheblich, *foxO3a* wies die stärkste, *foxO1a* und *foxO4* eine geringere aber in Relation zur Expression des

Haushaltsgens  *$\beta$ -2-mikroglobulin* quantifizierbare Expression auf. Folglich wurde im nächsten Schritt die Lokalisation der FoxO1a-, FoxO3a- und FoxO4-Proteine in A549-Zellen untersucht. Aufgrund der geringen Expression des *foxO6*-Gens wurde in weiterführenden Versuchen von der Analyse des FoxO6-Proteins abgesehen.

In Anlehnung an die in Abschnitt 4.2.1 vorgestellten Versuche zur Analyse einer stress-induzierten FoxO-Aktivierung in *Drosophila* (Abb. 4.3 - 4.7) wurden A549-Zellen gleichen Stressoren ausgesetzt.

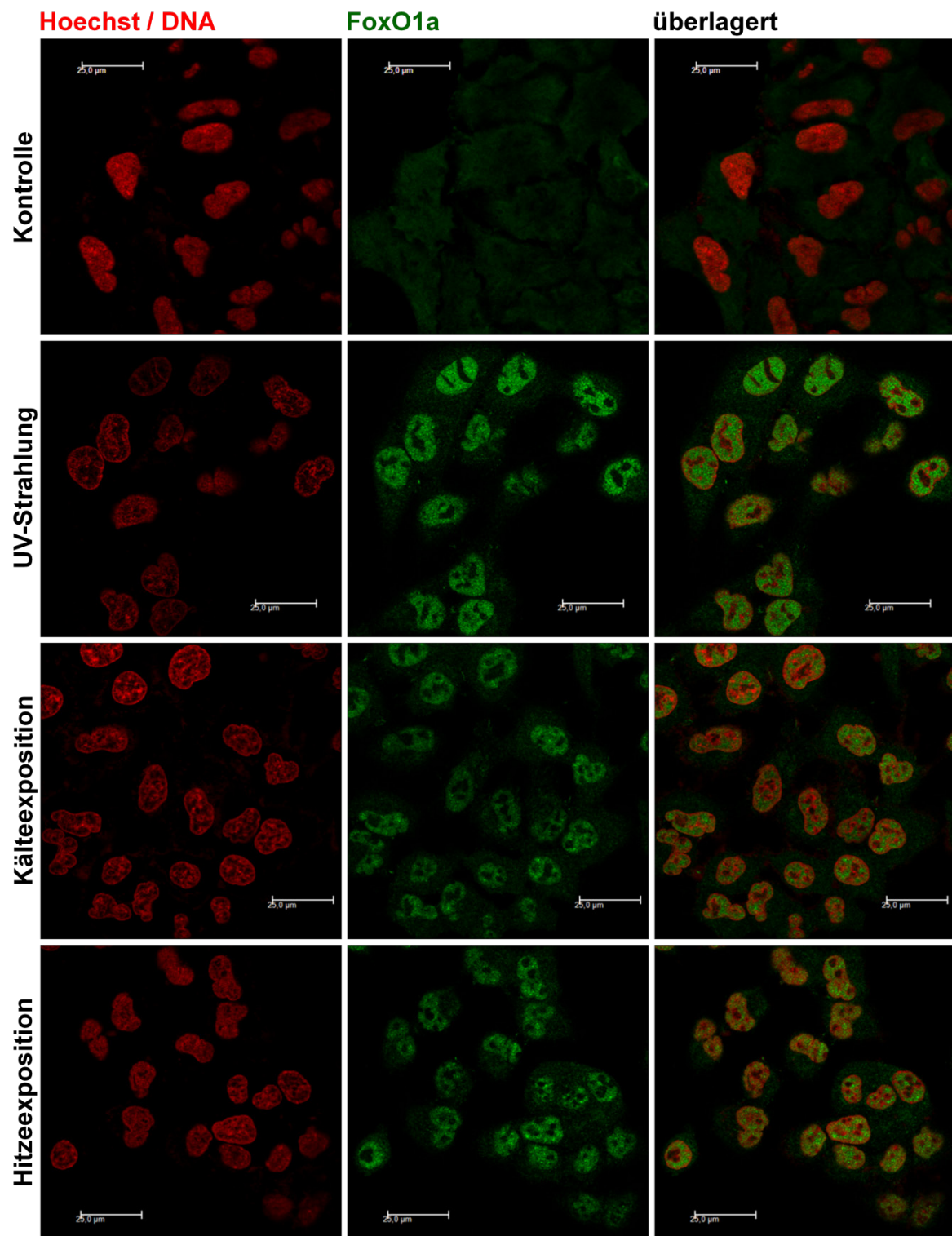


**Abb. 4.9: Aktivierung des FoxO1a-Proteins durch metabolischen und oxidativen Stress in humanen Epithelzellen der Linie A549**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, wurde das FoxO1a-Protein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Hungerbedingungen wurden durch den Ersatz des Nährmediums durch PBS induziert. Die Zellen reagierten mit einer FoxO1a-Aktivierung, detektiert durch eine Akkumulation des Proteins im Nukleus. Oxidativer Stress, induziert durch Paraquat [20 mM], resultierte ebenfalls in einer nukleären FoxO1a-Translokation.

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Die Lokalisierung des Proteins erfolgte unter Verwendung eines FoxO1a-spezifischen Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.





**Abb. 4.10: Aktivierung des FoxO1a-Proteins durch exogene Stressoren in humanen Epithelzellen der Linie A549**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, wurde das FoxO1a-Protein gleichermaßen im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert. Analysiert wurden exogene Umweltstressoren wie niedrige und hohe Temperaturen sowie UV-Strahlung. Alle getesteten Stressoren induzierten eine FoxO1a Translokation und Akkumulation im Kern.

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Die Lokalisierung des Proteins erfolgte unter Verwendung eines FoxO1a-spezifischen Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

Die Verteilung der FoxO-Proteine wurde mittels Immunfluoreszenz detektiert. Dabei wurden die Stressparameter in Dauer und Intensität an die *in vitro*-Bedingungen angeglichen. Um Hunger zu simulieren, wurde Medium durch PBS ersetzt. Oxidativer Stress wurde durch Zugabe von 20 mM Paraquat ins Medium induziert. Anders als in Versuchen mit *Drosophila*-Larven wurde die UV-Exposition auf 5 min verkürzt, Kälte- und Hitzestress erfolgten bei 4°C bzw. 41°C im Medium. Die mikroskopische Analyse der Zellen erfolgte stets 1 h nach Stressinduktion.

In Zellen, die unter optimalen Bedingungen bei einer physiologischen Temperatur und Gaszusammensetzung, sowie einer ausreichenden Nährstoffversorgung kultiviert wurden, wurde das FoxO1a-Protein entweder ausschließlich in Zytoplasma (Abb. 4.9 - Kontrolle) oder gleichermaßen im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert (Abb. 4.10 - Kontrolle). In beiden Fällen war die Verteilung gleichmäßig ohne erkennbare Präferenz zu bestimmten Zellkompartimenten.

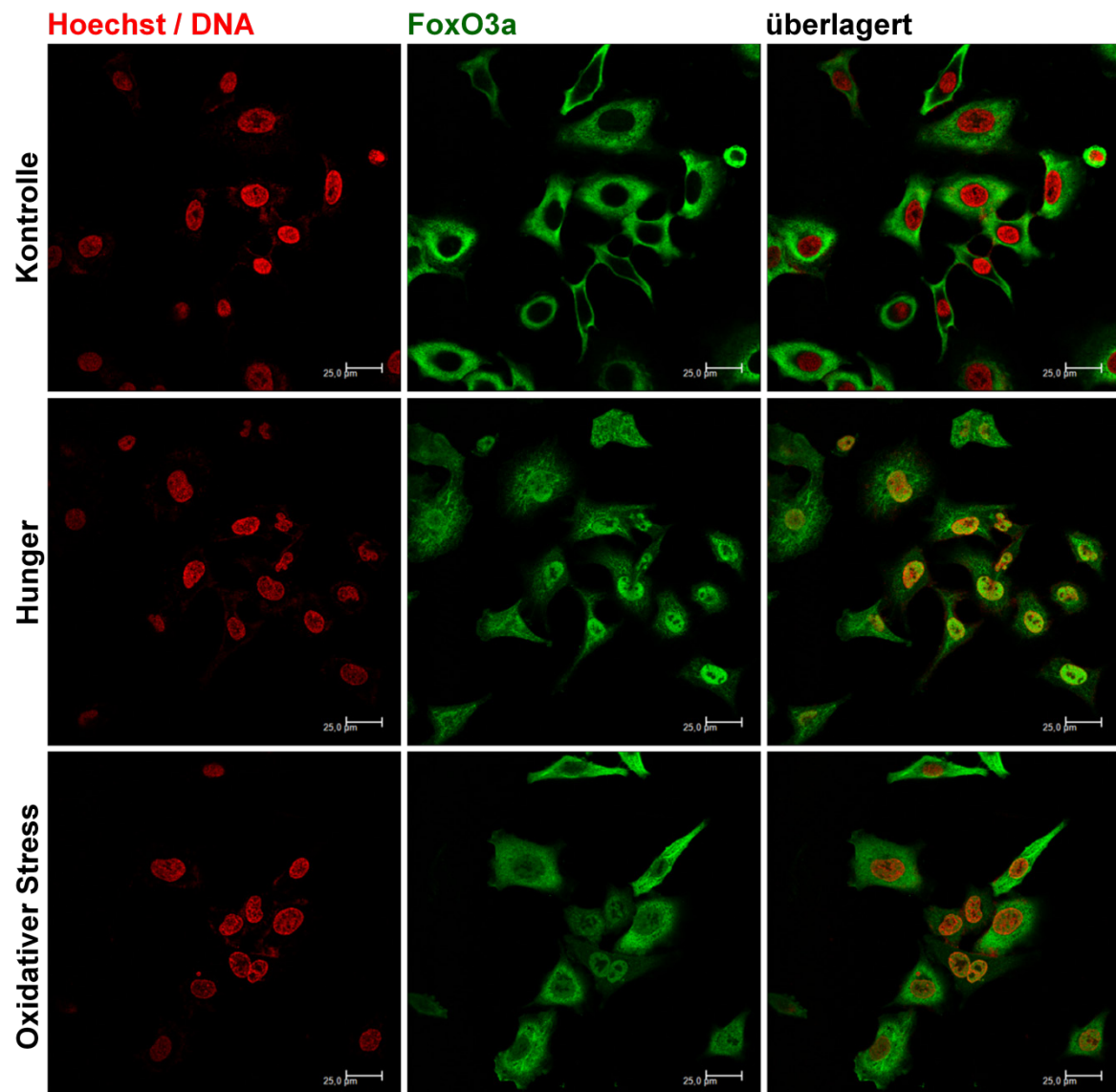
Nach einer Stunde hatten alle fünf getesteten Stressoren eine Zellkerntranslokation des FoxO1a-Proteins induziert (Abb. 4.9 und 4.10). Wie bereits zuvor für das homologe *Drosophila*-FoxO nachgewiesen, konnte das humane FoxO1a-Protein als zentraler Stressmediator in alveolären Epithelzellen identifiziert werden, das durch eine heterogene Auswahl an Stressoren eine Aktivierung und Kerntranslokation erfährt.

In gleicher Weise wie für die Charakterisierung des FoxO1a, wurde die Lokalisierung des FoxO3a-Proteins in A549-Zellen untersucht.

In Zellen, die unter optimalen Bedingungen bei einer physiologischen Temperatur und Gaszusammensetzung, sowie einer ausreichenden Nährstoffversorgung kultiviert wurden, zeigte das FoxO3a entweder eine rein zytoplasmatische (Abb. 4.11 - Kontrolle) oder zusätzlich eine geringe nukleäre Lokalisation (Abb. 4.12 - Kontrolle). Anders als bei FoxO1a wies die untersuchte Zellpopulation eine hohe Variabilität des FoxO3a-Verteilungsmusters auf. Neben einer regelmäßigen zytoplasmatischen Verteilung war in einem überwiegenden Teil der Zellen das Protein in netzartigen Strukturen angeordnet, was eine zytoskelettale Lokalisation vermuten lässt.

Für die Lokalisierung aller drei humanen FoxO-Proteine wurden Zellen identischen Stressbedingungen ausgesetzt, dennoch zeigte FoxO3a ein gänzlich anderes Aktivierungsmuster als FoxO1a. Nach einer Stunde Stressstimulation war eine allgemein schwächere oder langsamer ablaufende FoxO3a-Translokation zu verzeichnen. Hunger hatte die stärkste nukleäre Translokation zufolge (Abb. 4.11). Des Weiteren konnte eine FoxO3a-Aktivierung durch oxidativen und UV-Stress induziert werden (Abb. 4.11 und 4.12). In A549-Zellen, die einem Kälte- sowie einem Hitzeschock ausgesetzt waren, konnte keine FoxO3a-Migration detektiert werden (Abb. 4.12).

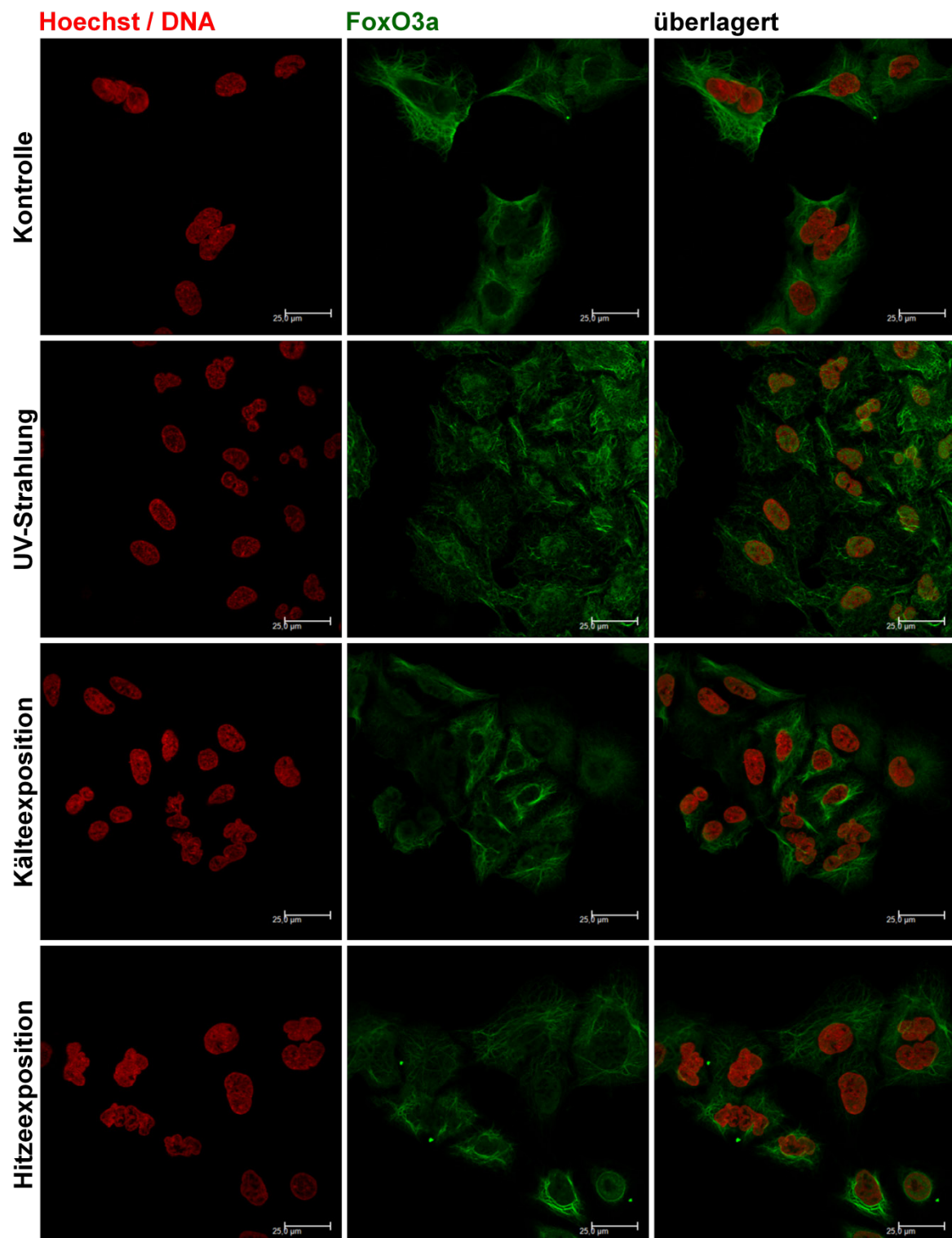
Im Gegensatz zum *Drosophila*-FoxO und humanen FoxO1a, die auf Stresssituationen mit einer schnellen und generalisierten Aktivierung reagierten, zeigte FoxO3a ein spezifiziertes Aktivierungsmuster mit einer deutlichen Präferenz für starke Stressoren, wie metabolischen, oxidativen und ionisierenden Stress.



**Abb. 4.11: Aktivierung des FoxO3a-Proteins durch metabolischen und oxidativen Stress in humanen Epithelzellen der Linie A549**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, wurde das FoxO3a-Protein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Die Proteinkonzentration variierte dabei zwischen den Zellen. Hungerbedingungen wurden durch den Ersatz des Nährmediums durch PBS induziert, die Zellen reagierten mit einer FoxO3a-Aktivierung, detektiert durch eine Akkumulation des Proteins im Nukleus. Oxidativer Stress, induziert durch Paraquat [20 mM], resultierte ebenfalls in einer nukleären FoxO3a-Translokation, dabei war das Protein gleichermaßen im Kern und im Zytoplasma verteilt.

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Die Lokalisierung des Proteins geschah unter Verwendung eines FoxO3a-spezifischen Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

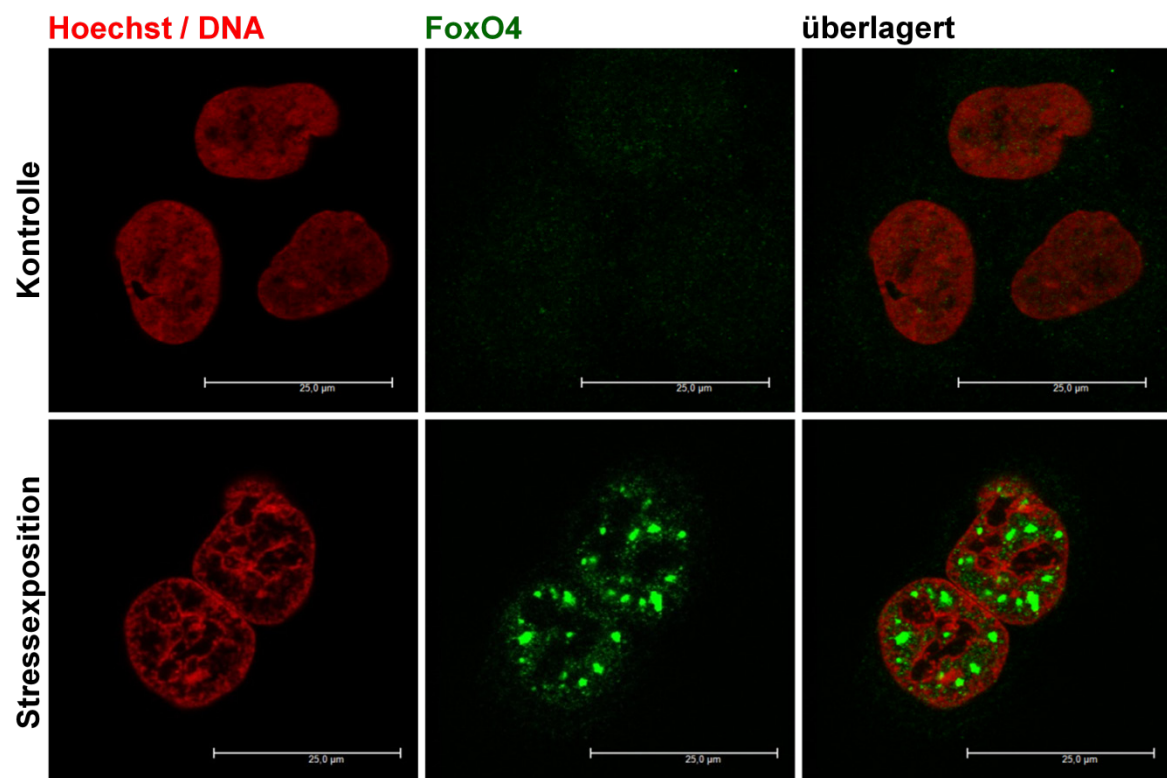


**Abb. 4.12: Aktivierung des FoxO3a-Proteins durch exogene Stressoren in humanen Epithelzellen der Linie A549**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, wurde das FoxO3a-Protein vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Analysiert wurden exogene Umweltstressoren wie niedrige und hohe Temperaturen sowie UV-Strahlung. Unter den getesteten Stressoren induzierte nur UV-Strahlung eine FoxO3a-Translokation.

Um die Zellkerne zu visualisieren wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Die Lokalisierung des Proteins geschah unter Verwendung eines FoxO3a-spezifischen Antikörpers. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.



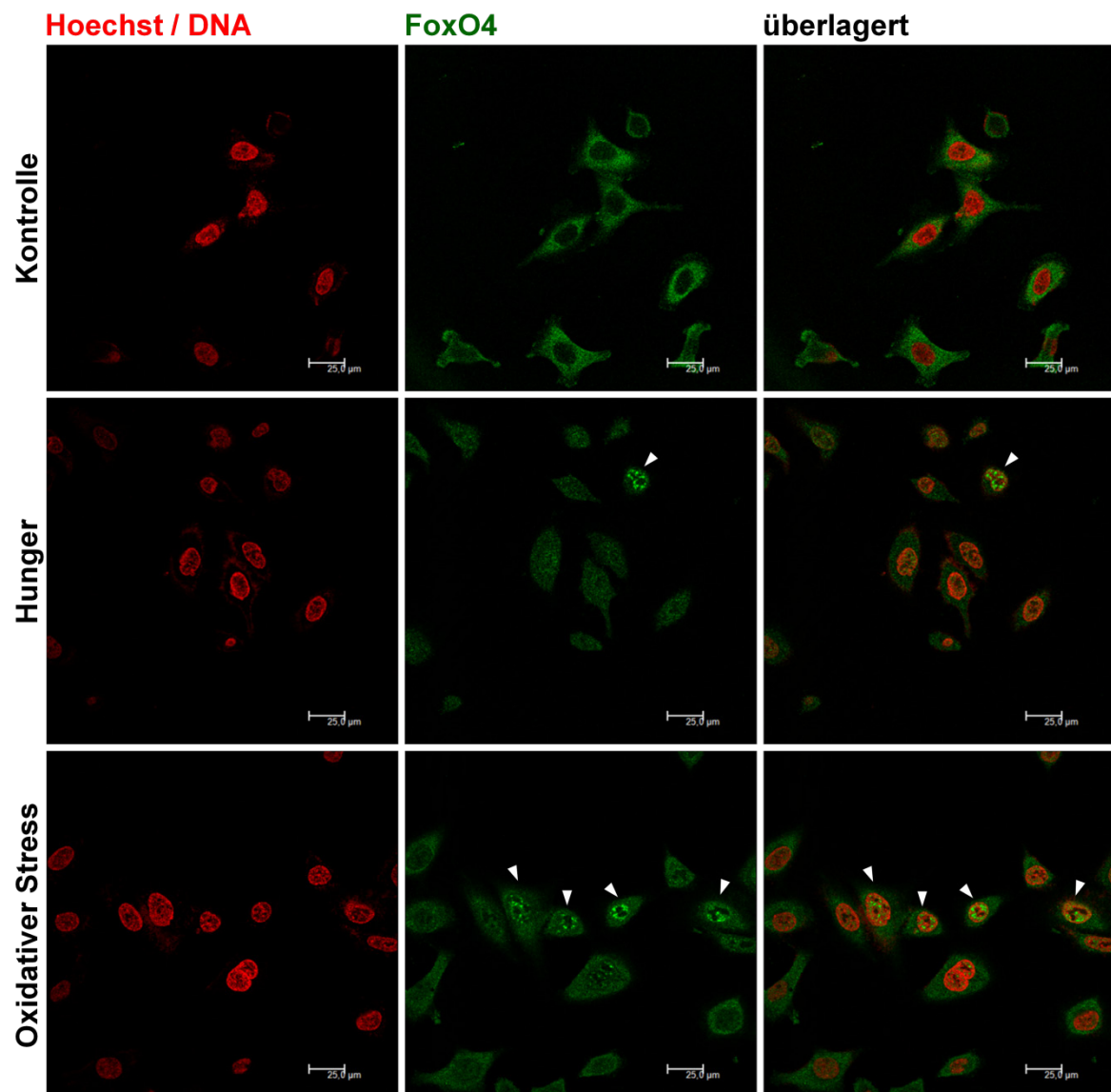


**Abb. 4.13: Lokalisierung des FoxO4-Proteins im Zellkern infolge einer Stressexposition**

In einer repräsentativen Aufnahme wurde das FoxO-Akkumulationsmuster im Kern einer Epithelzelle dokumentiert. In Zellen der Linie A549, unter optimalen Kulturbedingungen inkubiert, wurde das FoxO4-Protein in einer diffusen Verteilung im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert. Eine beliebige Stressexposition (hier UV-Stress) induzierte eine Kerntranslokation des Proteins, das sich in Aggregaten innerhalb des Zellkerns verdichtete.

Um die Zellkerne zu visualisieren wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Die Lokalisierung des Proteins geschah unter Verwendung eines FoxO4-spezifischen Antikörpers.

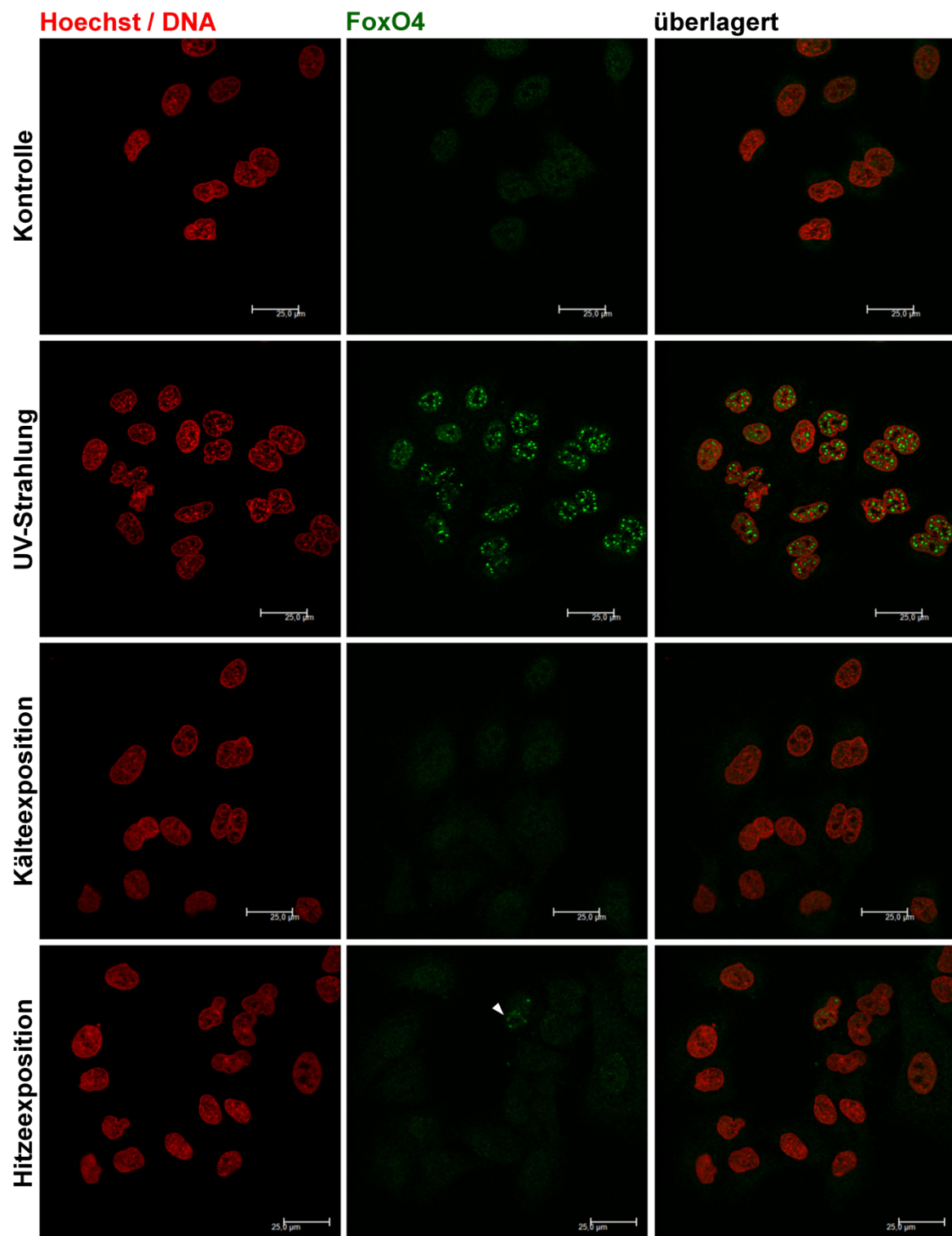
In Zellen, die unter optimalen Kontrollbedingungen inkubiert wurden, zeigte das FoxO4-Protein ein Verteilungsmuster, das dem des FoxO1a entsprach. Das Protein war entweder ausschließlich in Zytoplasma (Abb. 4.14 - Kontrolle) oder gleichermaßen im Zytoplasma und Kern lokalisiert (Abb. 4.13 und 4.15 - Kontrolle). Dabei war die Verteilung gleichmäßig ohne erkennbare Kollokalisierung mit Zellkompartimenten. Eine gänzlich andersartige Verteilung des Proteins trat nach Stressexposition zutage. Anders als FoxO1a und FoxO3a akkumulierte FoxO4 in optisch dichten Aggregaten innerhalb des Zellkerns wie in Abbildung 4.13 in einem Beispiel veranschaulicht.



**Abb. 4.14: Aktivierung des FoxO4-Proteins durch metabolischen und oxidativen Stress in humanen Epithelzellen der Linie A549**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, wurde das FoxO4-Protein im Zytoplasma, bzw. gleichmäßig im Zytoplasma und Zellkern verteilt, lokalisiert. Nach einer einstündigen Hungerphase, in der das Nährmedium durch PBS ersetzt wurde, konnte in einigen Zellen eine FoxO4-Translokation detektiert werden (Pfeile). Oxidativer Stress, induziert durch Paraquat [20 mM], resultierte ebenfalls in einer nukleären FoxO4-Translokation (Pfeile). In beiden Fällen sammelte sich das Protein in Aggregaten innerhalb des Zellkerns.

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.



**Abb. 4.15: Aktivierung des FoxO4-Proteins durch exogene Stressoren in humanen Epithelzellen**

In Zellen der Linie A549, inkubiert unter optimalen Kulturbedingungen, zeigte das FoxO4-Protein eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma und Nukleus.

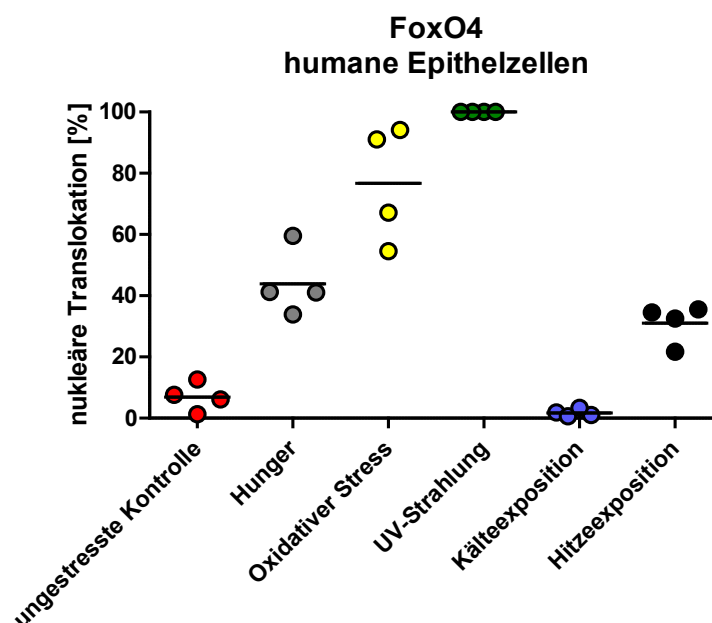
Exogene Umweltstressoren wie niedrige (4°C) und hohe Temperaturen (41°C) führten zu keiner bzw. einer schwachen Aktivierung des FoxO4-Transkriptionsfaktors in humanen Epithelzellen. UV-Strahlung hingegen induzierte eine nukleäre FoxO4-Akkumulation in allen Zellen der analysierten Population. Dabei sammelte sich das Protein in Aggregaten innerhalb des Zellkerns.

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

Die getesteten Stressoren wiesen unterschiedliche Potentiale der Aktivierung des FoxO4-Transkriptionsfaktors auf. Dies äußerte sich darin, dass beispielsweise UV-Strahlung in allen Zellen einer analysierten Population eine FoxO4-Translokation induzierte, Hunger hingegen in nur wenigen Zellen (Abb. 4.14 und 4.15). Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden Zellen, die eine FoxO4-Translokation aufwiesen, quantifiziert (Abb. 4.16).

Die stärkste FoxO4-Aktivierung wurde durch UV-Strahlung provoziert, die in 100 % der untersuchten Zellen zu einer Anreicherung des Proteins im Kern führte. Oxidativer Stress induzierte eine Translokation in durchschnittlich 80 %, Hunger in 45 %, Hitzestress in 30 % der stressexponierten Zellen. Kältestress bewirkte keine FoxO4-Aktivierung.

Zusammengefasst wies unter den humanen FoxO-Transkriptionsfaktoren FoxO4 ein einzigartiges Aktivierungsmuster auf. Dabei konnte eine eindeutige Rangfolge innerhalb der getesteten Stressfaktoren, bezüglich ihres Potentials eine FoxO4-Translokation zu induzieren, festgestellt werden.



**Abb. 4.16: Quantifizierung der stressinduzierten FoxO4-Translokation in humanen Epithelzellen der Linie A549**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen, in denen eine nukleäre Translokation infolge einer Stressorstimulation beobachtet wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch Zählen der Zellen zufällig gewählter Areale aus vier unabhängigen Versuchen mit  $n=100-300$  Zellen/Areal.

In diesem Teil der Arbeit wurden drei der vier humanen FoxO-Proteine in Bezug auf ihre Funktion als Stressmediator in respiratorischen Epithelzellen charakterisiert. Aus den Beobachtungen konnten drei wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: 1) wie das *Drosophila*-FoxO werden auch drei der vier humanen Homologe FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 durch unterschiedliche Formen des physiologischen Stresses in respiratorischen Epithelzellen aktiviert, 2) nur FoxO1a zeigt ein unspezifisches Aktivierungsmuster und

konnte als funktionelles Homolog des *Drosophila*-FoxO identifiziert werden und 3) FoxO3a und FoxO4 zeigen eine selektive Aktivierbarkeit durch spezifische Stressoren.

### 4.3 Stress induziert die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in *Drosophila melanogaster*

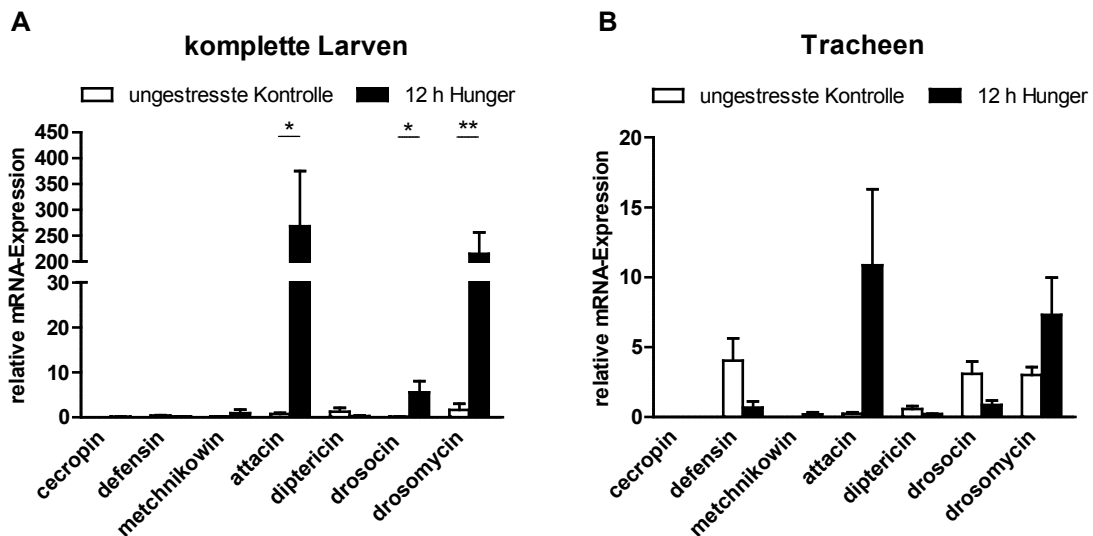
Stress induzierte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO im respiratorischen Epithel larvaler Tracheen, was durch eine Zellkerntranslokation des Proteins, wie in Abschnitt 4.2.1 veranschaulicht, demonstriert werden konnte. Stress bedingt die Aktivierung vielfältiger Mechanismen, um die Zelle vor Schäden zu schützen, ihr Überleben zu sichern bzw. Apoptose einzuleiten um das umgebende Gewebe zu erhalten [112],[113]. Eine der zentralen Fragen, der sich diese Arbeit widmet, ist die Korrelation zwischen Stress-Input und Immunantwort.

Wie im Kapitel 1.3 vorgestellt, ist die Immunreaktion in *Drosophila* durch die Synthese Antimikrobieller Peptide (AMPs) charakterisiert. Um eine stressinduzierte Immunreaktion zu analysieren, wurden Larven des Wildtypstamms Canton-S gleichen Stressbedingungen ausgesetzt wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Nach der Stressexposition wurde die Expression der sieben AMP-Genfamilien sowohl im kompletten Larvengewebe, als auch im Tracheenepithel quantifiziert.

In *Drosophila*-Larven, die einer 12-stündigen Hungerphase ausgesetzt waren, konnte eine infektionsunabhängige Immunreaktion beobachtet werden. Diese manifestierte sich im Expressionsanstieg einiger AMP-Gene. In kompletten L3-Larven wurde eine mehrhundertfache Zunahme der *attacin*- und *drosomycin*-Expression sowie eine fünfzigfach erhöhte *drosocin*-Expression ermittelt (Abb. 4.17 A). In Übereinstimmung damit wurde auch im isolierten Epithelgewebe larvaler Tracheen eine höhere *attacin*- und *drosomycin*-Expression, als im Epithel ungestresster Individuen beobachtet (Abb. 4.17 B). Wie in Abb. 4.18 A dargestellt, induzierte oxidativer Stress im kompletten Larvengewebe einen Expressionsanstieg ausschließlich des *drosomycin*-Gens, während das Expressionsniveau aller übrigen AMPs dem Level der ungestressten Kontrolltiere glich.

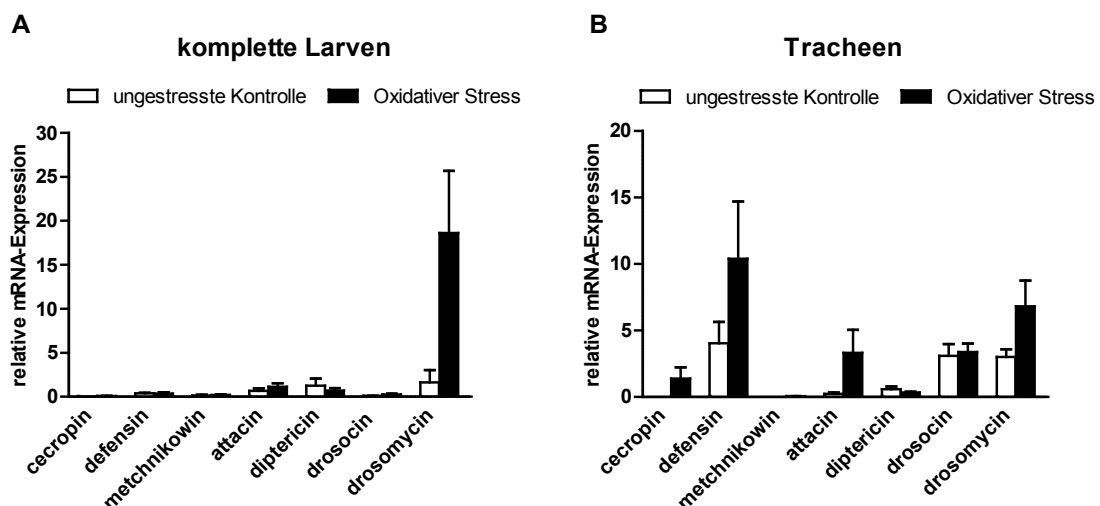
Im isolierten Epithelgewebe der Larven, die der ROS-generierenden Substanz Paraquat ausgesetzt waren, war eine Erhöhung in der Expression mehrerer AMP-Gene zu verzeichnen. Neben einer *drosomycin*-Expression, provozierten ROS auch eine *attacin*-, *cecropin*- und *defensin*-Transkription im Epithelgewebe (Abb. 4.18 B).

Nicht nur im kompletten Gewebe, sondern auch im separierten Tracheenepithel von Larven, die UV-Strahlung, Kälte und Hitze ausgesetzt waren, wurde im Vergleich zu unbehandelten Larven, kein eindeutiger Anstieg der AMP-Expression gemessen (Abb. 4.19 - 4.21).



**Abb. 4.17: Hungerstress induziert eine verstärkte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene systemisch und lokal im larvalen Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

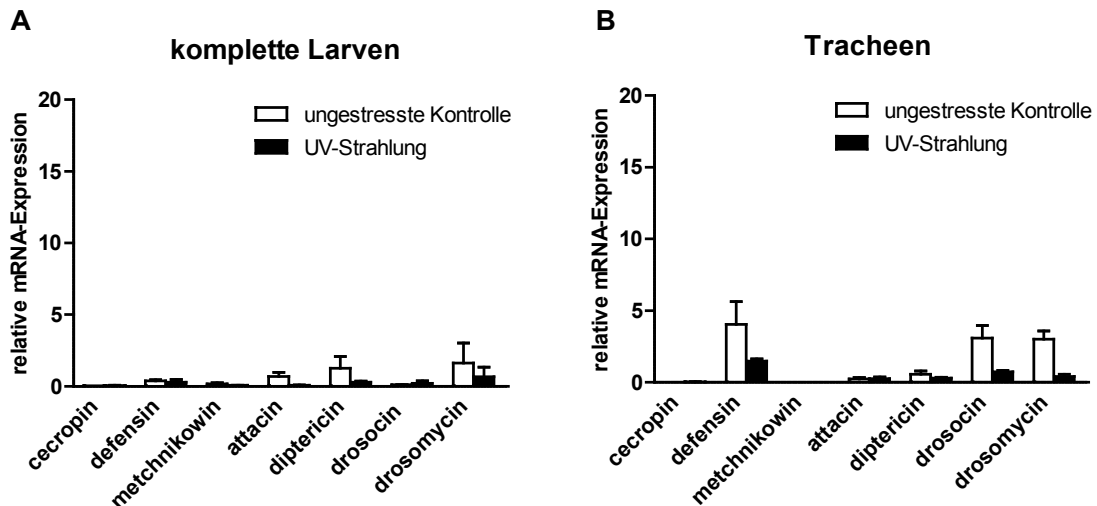
Die Expressionen Antimikrobieller Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der AMPs in kompletten L3-Larven der Wildtyp-Linie Canton-S (A) sowie im isolierten Epithel der larvalen Atemwege (B). Weiße Balken geben die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Schwarze Balken stellen die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven dar, die einer 12-stündigen Hungerphase ausgesetzt waren. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven bzw. n=50 Tracheen. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).



**Abb. 4.18: Oxidativer Stress induziert eine verstärkte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene systemisch und lokal im larvalen Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

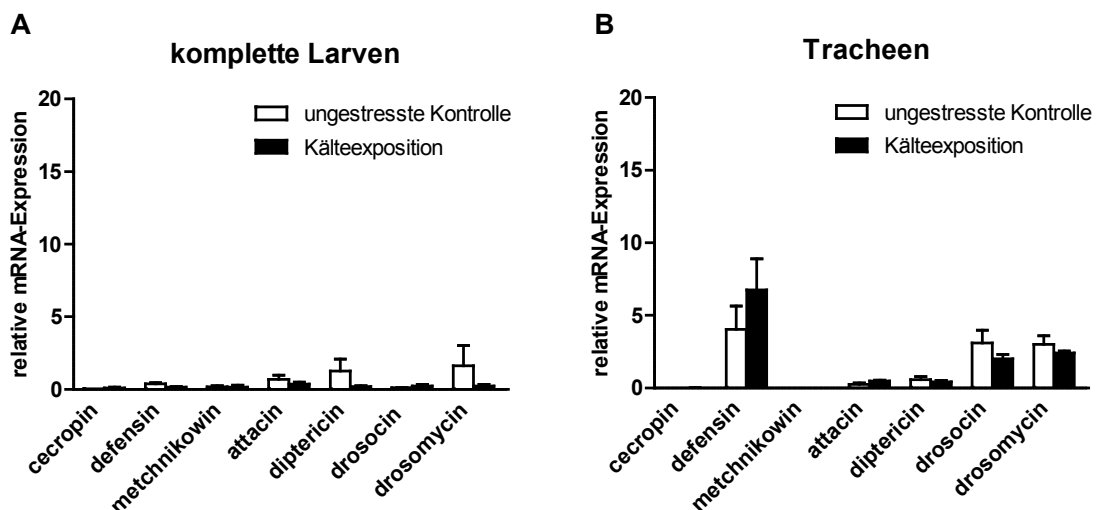
Die Expressionen Antimikrobieller Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der AMPs in kompletten L3-Larven der Wildtyp-Linie Canton-S (A) sowie im isolierten Epithel der larvalen Atemwege (B). Weiße Balken geben die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Schwarze Balken stellen die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven dar, die für 2 h oxidativem Stress ausgesetzt waren, induziert durch 100 mM Paraquat. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven bzw. n=50 Tracheen.





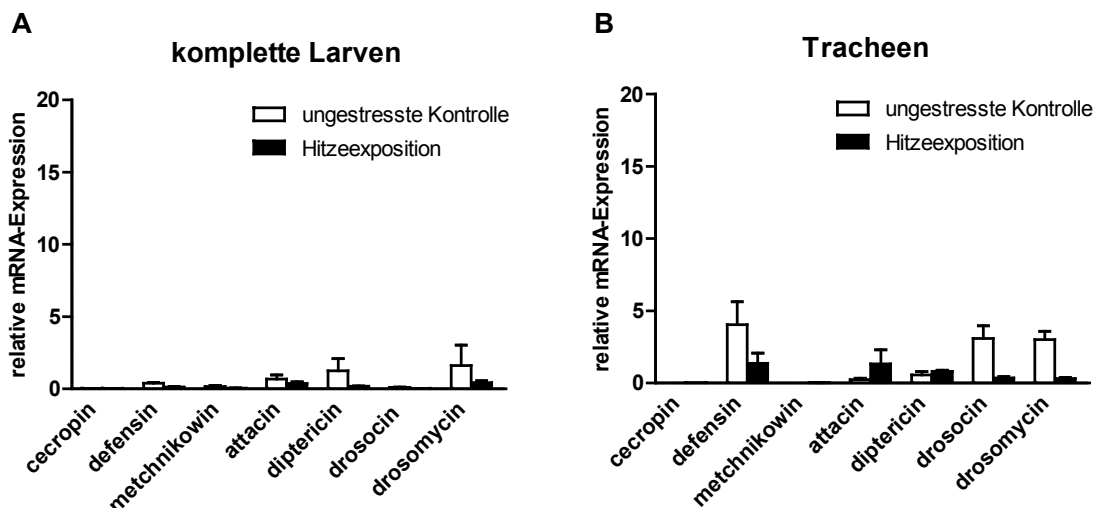
**Abb. 4.21: UV-Strahlung induziert keine verstärkte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene weder systemisch noch lokal im larvalen Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

Die Expressionen Antimikrobieller Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt, zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der AMPs in kompletten L3-Larven der Wildtyplinie Canton-S (A) sowie im isolierten Epithel der larvalen Atemwege (B). Weiße Balken geben die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Schwarze Balken stellen die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven dar, die für 15 min mit UV-Licht bestrahlt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven bzw. n=50 Tracheen.



**Abb. 4.19: Kältestress induziert keine verstärkte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene weder systemisch noch lokal im larvalen Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

Die Expressionen Antimikrobieller Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt, zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der AMPs in kompletten L3-Larven der Wildtyplinie Canton-S (A) sowie im isolierten Epithel der larvalen Atemwege (B). Weiße Balken geben die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Schwarze Balken stellen die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven dar, die für zwei Stunden einem Kältestress bei 4°C ausgesetzt waren. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven bzw. n=50 Tracheen.



**Abb. 4.20: Hitzestress induziert keine verstärkte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene weder systemisch noch lokal im larvalen Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

Die Expressionen Antimikrobieller Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt, zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der AMPs in kompletten L3-Larven der Wildtyp-Linie Canton-S (A) sowie im isolierten Epithel der larvalen Atemwege (B). Weiße Balken geben die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Schwarze Balken stellen die AMP-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven dar, die für 30 min einem Hitzestress bei 41°C ausgesetzt waren. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven bzw. n=50 Tracheen.

Die Expression und Freisetzung von AMPs ist ein fundamentaler Prozess in der Immunabwehr von *Drosophila melanogaster* als Reaktion auf eine mikrobielle Invasion [13]. Hier konnte veranschaulicht werden, dass auch ohne einen Pathogenkontakt die Expression verschiedener AMPs durch Stressoren, insbesondere Ernährungs- und oxidativen Stress, induziert werden kann.

#### 4.4 Hunger induziert eine NF- $\kappa$ B-unabhängige AMP-Expression vermittelt durch den Transkriptionsfaktor FoxO und die Insulin/IGF-Signalkaskade

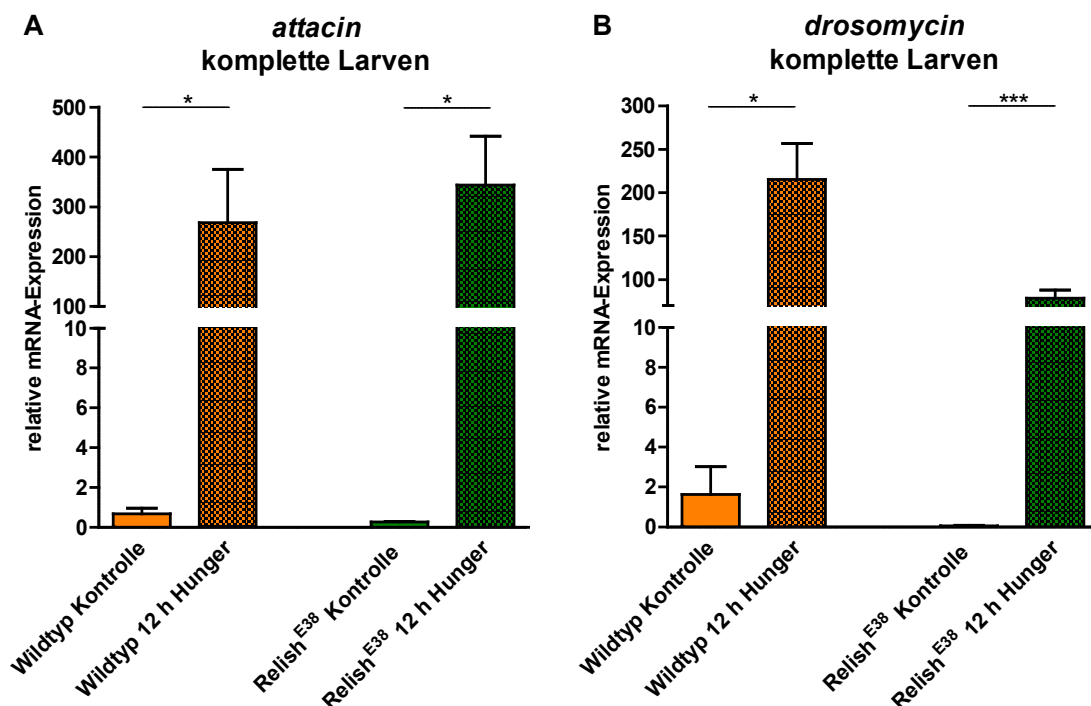
##### 4.4.1 Die durch Hunger induzierte AMP-Regulation erfolgt unabhängig von den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Relish und Dorsal

Der kanonische zur Expression der AMP-Gene führende Weg, wird durch Kontakt des Organismus mit Pathogenen ausgelöst. Dabei interagieren PAMPs mit Rezeptoren und setzen einen der Hauptreaktionswege des angeborenen Immunsystems in Gang, nämlich den Toll- oder den IMD-Signalweg. Diese Wege aktivieren die Transkriptionsfaktoren Dorsal, DIF bzw. Relish, die die AMP-Expression induzieren [13]. In Anlehnung an die in Kapitel 4.3 dargestellte Beobachtung einer infektiionsunabhängigen Hunger-induzierten



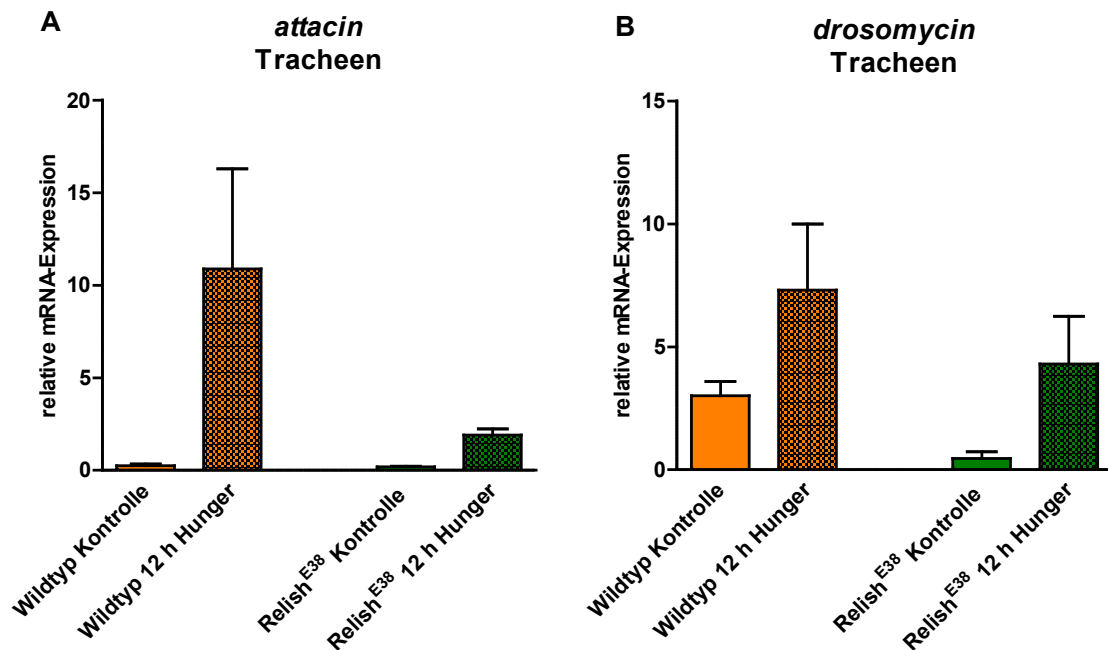
AMP-Expression bestand das nächste Ziel in der Charakterisierung des dafür verantwortlichen Mechanismus.

Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben und in Abbildung 4.3 präsentiert, konnte im larvalen Atemwegsepithel hungernder Larven keine nukleäre Translokation des, durch den Toll-Signalweg aktivierten, Transkriptionsfaktors Dorsal beobachtet werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Dorsal an der Hunger-induzierten AMP-Expression nicht direkt beteiligt ist. Der IMD-regulierte Transkriptionsfaktor Relish hingegen zeigte nach einer 12-stündigen Hungerphase eine Zellkerntranslokation (Abb. 4.3). Dies macht Relish zu einem potentiellen Kandidaten für eine durch Ernährungsstress regulierte AMP-Expression. Um dies zu untersuchen, wurde die transgene *Drosophila*-Linie Relish<sup>E38</sup> herangezogen. Die Tiere dieser *knock out*-Linie tragen eine Mutation an der Transkriptionsstartstelle des *relish*-Gens, die die Synthese des Proteins unterbindet [114].



**Abb. 4.22: Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in kompletten Larven wird nicht durch den Transkriptionsfaktor Relish gesteuert**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene *attacin* (A) und *drosomycin* (B) wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen in kompletten L3-Larven der Wildtyplinie Canton-S sowie der Relish-*knock out*-Linie Relish<sup>E38</sup>. Nach einer 12-stündigen Hungerphase wurde in Larven beider Linien eine vielfach erhöhte *attacin*- sowie *drosomycin*-Expression gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).



**Abb. 4.23: Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene im larvalen Atemwegsepithel wird nicht durch den Transkriptionsfaktor Relish gesteuert**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene *attacin* (A) und *drosomycin* (B) wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen im isolierten larvalen Atemwegsepithel der Wildtyplinie Canton-S sowie der Relish-*knock out*-Linie Relish<sup>E38</sup>. Nachdem Larven einer 12-stündigen Hungerphase ausgesetzt waren, wurde in ihrem Tracheenepithel eine erhöhte *attacin*- sowie *drosomycin*-Expression gemessen, wie es zuvor im kompletten Gewebe gezeigt werden konnte. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste:  $n=50$ . (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

In gleicher Weise wie in Kapitel 4.2.1 und 4.3 ausführlich erläutert, wurden Relish<sup>E38</sup>-Larven für 12 h einem Hungerstress ausgesetzt. Anschließend wurden in einer *real-time* PCR die *attacin*- und *drosomycin*-Expressionsniveaus im gesamten Larvengewebe sowie im isolierten Atemwegsepithel quantifiziert (Abb. 4.22 und 4.23), da diese in Wildtyp-Larven die stärkste Hunger-induzierte Regulierung gezeigt hatten (Abb. 4.17).

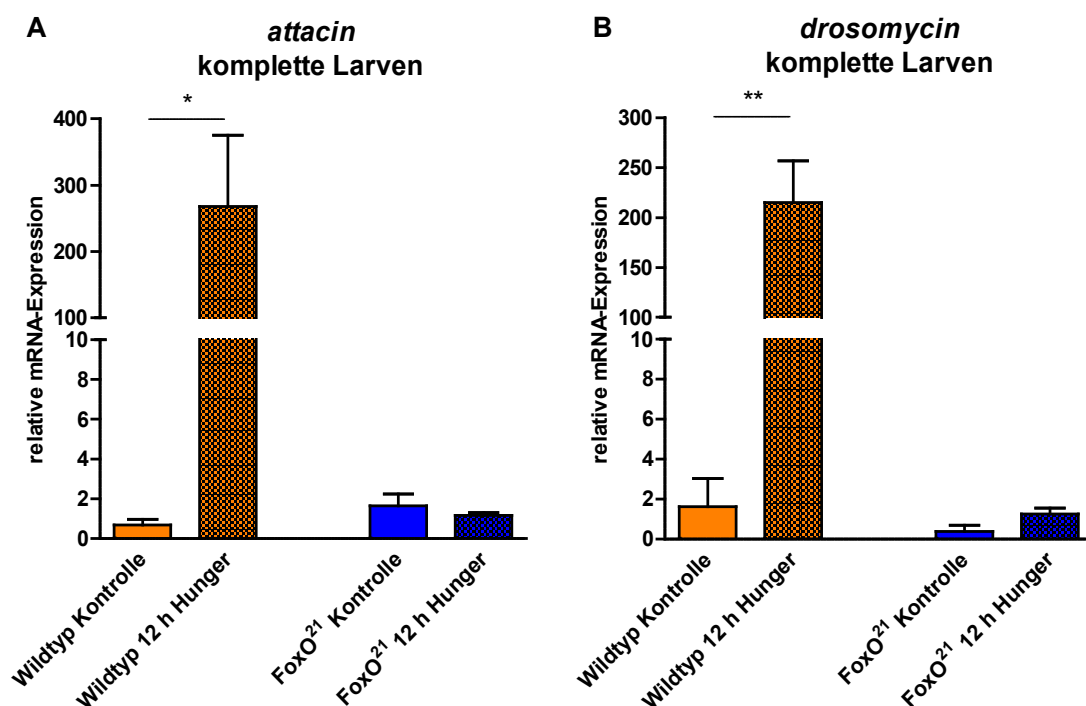
In der Abbildung 4.22 sind die relativen *attacin*- und *drosomycin*-Expressionen in kompletten Larven dargestellt. Zu einer besseren Veranschaulichung geben orange Balken die Expression in Larven des Wildtypstamms Canton-S und grüne Balken die der Relish-defizienten Relish<sup>E38</sup>-Linie wieder. Entsprechend der Beobachtung in Wildtyp-Larven führte Hungerstress in Relish<sup>E38</sup>-Larven ebenfalls zu einer vielfachen Erhöhung sowohl der *attacin*- als auch der *drosomycin*-Expressionen.

Als Nächstes wurden auch die Expressionsniveaus dieser beiden AMP-Gene im isolierten Tracheengewebe quantifiziert (Abb. 4.23). Infolge einer Hungerphase wurde im larvalen Atemwegsepithel des Wildtyps eine 44-fache Erhöhung der *attacin*- sowie eine Verdoppelung der *drosomycin*-Expression gemessen. Im Gewebe der Relish<sup>E38</sup>-Linie induzierte Hunger eine 24-fach höhere *attacin*- und eine 9-fach höhere *drosomycin*-Expression, verglichen mit dem Expressionsniveau im Gewebe normalgefütterter

Kontrolltiere. In Anbetracht der in Abbildung 4.22 und 4.23 präsentierten Ergebnisse, konnte die Möglichkeit, dass es sich bei der Hunger-induzierten AMP-Expression in *Drosophila*-Larven um einen Relish-regulierten Prozess handelt, widerlegt werden. Eine Zusammenfassung der Beobachtungen bis hierher erlaubt das Aufstellen der Hypothese, dass die durch Hunger induzierte AMP-Expression unabhängig von den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Dorsal und Relish erfolgt, und somit nicht das Resultat der konventionellen Toll- und IMD-Signalwegaktivierung ist.

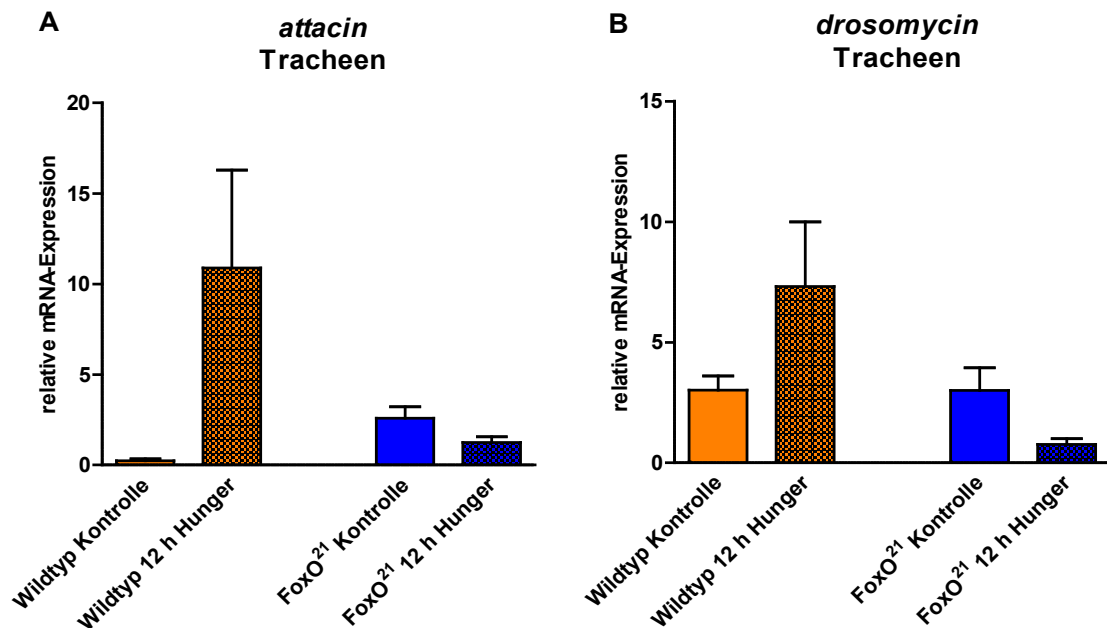
#### 4.4.2 Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene ist ein FoxO-abhängiger Prozess

Da die infolge von Hunger auftretende Expressionszunahme von *attacin* und *drosomycin* nicht durch Dorsal und Relish gesteuert wird, ist die Frage nach dem verantwortlichen Mechanismus nach wie vor offen.



**Abb. 4.24: Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in kompletten Larven wird durch den Transkriptionsfaktor FoxO gesteuert**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene *attacin* (A) und *drosomycin* (B) wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen in kompletten L3-Larven der Wildtyp-Linie Canton-S sowie der FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup>. Nach einer 12-stündigen Hungerphase wurde in Larven der Wildtyp-Linie eine vielfach erhöhte *attacin*- sowie *drosomycin*-Expression gemessen. In Larven der FoxO-*knock out*-Linie konnte keine Hunger-induzierte *attacin*- und *drosomycin*-Expression detektiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).



**Abb. 4.25: Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene im larvalen Atemwegsepithel wird durch den Transkriptionsfaktor FoxO gesteuert**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene *attacin* (A) und *drosomycin* (B) wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen im isolierten larvalen Atemwegsepithel der Wildtyplinie Canton-S sowie der FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup>. Nach einer 12-stündigen Hungerphase wurde im Atemwegsepithel der Wildtyplinie eine vielfach erhöhte *attacin*- sowie *drosomycin*-Expression gemessen. In Gewebe der FoxO-*knock out*-Linie konnte keine Hunger-induzierte *attacin*- und *drosomycin*-Expression detektiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=50. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

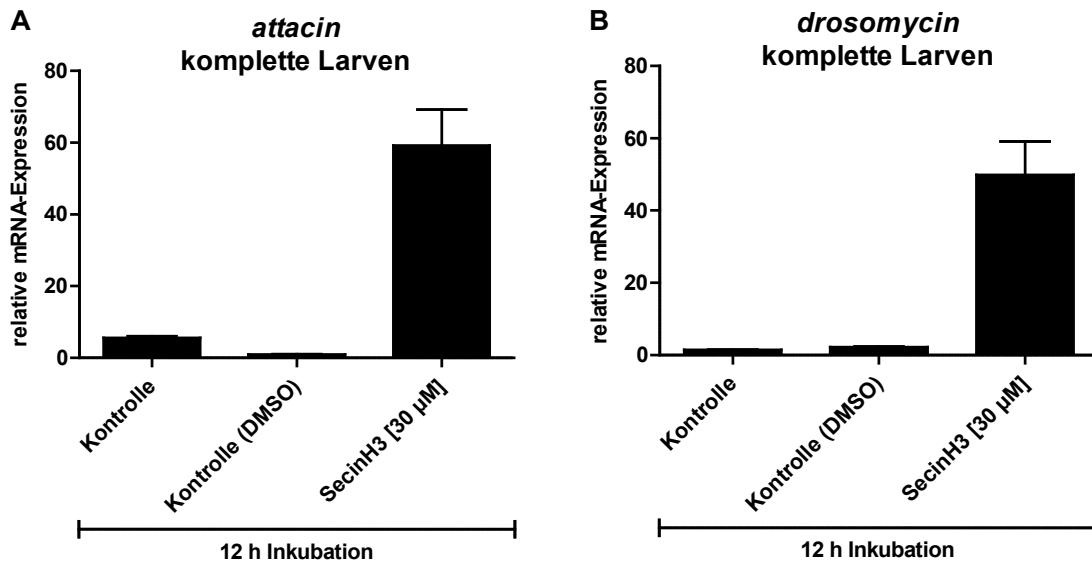
Neben einer Relish-Translokation, die im Fokus der in Kapitel 4.4.1 dargestellten Untersuchung lag, induzierte Hunger des Weiteren eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO im Tracheenepithel transgener *breathless*-GAL4::FoxO-GFP-Larven (Abb. 4.3). Deshalb wurde im Folgenden die Funktion von FoxO als potentieller AMP-Regulator untersucht. Zu diesem Zwecke wurde die in Kapitel 4.1 vorgestellte FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup> [109] herangezogen. Larven der FoxO<sup>21</sup>-Linie wurden für 12 h einem Hungerstress ausgesetzt. Anschließend wurden in einer *real-time* PCR die *attacin*- und *drosomycin*-Expressionsniveaus im gesamten Larvengewebe sowie im isolierten Atemwegsepithel quantifiziert (Abb. 4.24 und 4.25). Zwecks einer einfacheren Vergleichbarkeit geben in beiden Abbildungen orange Balken die Expression in Larven des Wildtypstamms Canton-S wieder. Relative Expressionswerte, die in FoxO<sup>21</sup>-Larven ermittelt wurden, sind in Form blauer Balken dargestellt. Im Gegensatz zu einer durch Hungerstress hervorgerufenen massiven *attacin*- und *drosomycin*-Expressionserhöhung in Wildtyp-Larven wiesen hungernde und normalgefütterte FoxO<sup>21</sup>-Larven annähernd identische AMP-Expressionsniveaus auf (Abb. 4.24). Die gleiche Tendenz der relativen *attacin*- und *drosomycin*-Expressionen wurde auch im respiratorischen Epithel sowohl der Wildtyp- als auch der FoxO-*knock out*-Larven beobachtet (Abb. 4.25).

Weder in kompletten FoxO<sup>21</sup>-Larven noch in isolierten Tracheen dieser Linie konnte eine infolge von Hunger auftretende *attacin*- oder *drosomycin*-Expressionszunahme ermittelt werden. Dies führt zu dem Fazit, dass FoxO eine entscheidende Schlüsselrolle in der durch Hungerstress ausgelösten AMP-Induktion erfüllt und direkt an der Transkription zumindest von *attacin* und *drosomycin* beteiligt ist. Die Identifikation von FoxO als *drosomycin*-Aktivator in einem NF-κB-unabhängigen Prozess wurde kürzlich in einer Publikation von Becker *et al.* [102] bestätigt. Da bisher die Induktion einer AMP-Expression als ein ausschließlich Dorsal, DIF oder Relish ausgeführter Prozess postuliert wurde, ist dies eine weitreichende Erkenntnis und macht den Transkriptionsfaktor FoxO zu einem potentiellen Vermittler zwischen Stress-Input und Immunantwort.

#### **4.4.3 Der Insulin/IGF-Signalweg als Kandidat für die Hunger-induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene**

Die bisher erbrachten Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass in *Drosophila*-Larven, die einer mehrstündigen Hungerphase ausgesetzt werden, der Transkriptionsfaktor FoxO eine Aktivierung erfährt und die Transkription der AMPs *attacin* und *drosomycin* induziert. Nun bleibt zu beantworten, welche Signaltransduktion durch Hungerstress reguliert wird und als Auslöser der FoxO-Aktivierung dient. Hunger stellt die radikalste Form des Nährstoffmangels dar. Der am besten untersuchte Prozess, der infolge einer sich ändernden Nährstoffversorgung reguliert wird und den zellulären Metabolismus koordiniert, ist der Insulin/IGF-Signalweg (ILS) [80],[81]. Ferner ist eine der ILS-Komponenten, die Kinase Akt ein gut dokumentierter Inhibitor des FoxO-Proteins [91],[82]. Wie in Abschnitt 1.4.3 ausführlich erläutert, deaktiviert Nährstoffmangel den ILS und somit auch Akt in seiner Funktion. Die daraus resultierende ausbleibende FoxO-Phosphorylierung entlässt das Protein aus seiner zytoplasmatischen Retention und macht den Weg frei für die Transkription von FoxO-Zielgenen [81],[104]. Um zu prüfen, ob ILS an der Hunger-induzierten AMP-Expression beteiligt ist, wurde die physiologische Auswirkung von Hunger auf den Insulin/IGF-Signalweg simuliert. Dies erfolgte durch eine gezielte Deaktivierung des ILS mittels des Zytosin-Antagonisten SecinH3 [87] und anschließender Messung der AMP-Expression.

In Anlehnung an die Hungerversuche wurden normalgefütterte Wildtyp-Larven für 12 h mit SecinH3 [30 µM] behandelt, was zur gezielten Blockade der ILS führt und somit in einer konstitutiven Aktivität von FoxO resultiert [86]. Die Quantifizierung der *attacin*- und *drosomycin*-Expression im kompletten Gewebe dieser Larven offenbarte eine eindeutige Expressionszunahme beider AMPs (Abb. 4.26).



**Abb. 4.26: Deaktivierung des Insulin/IGF-Signalweges in Wildtyp-Larven induziert eine *attacin*- und *drosomycin*-Expression**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene *attacin* (A) und *drosomycin* (B) wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen in kompletten L3-Larven der Wildtyplinie  $w^{1118}$  nach einer 12-stündigen Behandlung mit dem ILS-Inhibitor SecinH3 [30 µM]. Als Kontrolle dienten Larven, die für den gleichen Zeitraum im Insektenzellmedium bzw. Insektenzellmedium + 0,3 % DMSO inkubiert wurden. Die Deaktivierung des ILS durch SecinH3 induzierte eine *attacin*- und *drosomycin*-Expression. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel / Mittelwert zweier technischer Replikate  $\pm$  SD. Ein biologisches Replikat umfasste:  $n=10$  Larven.

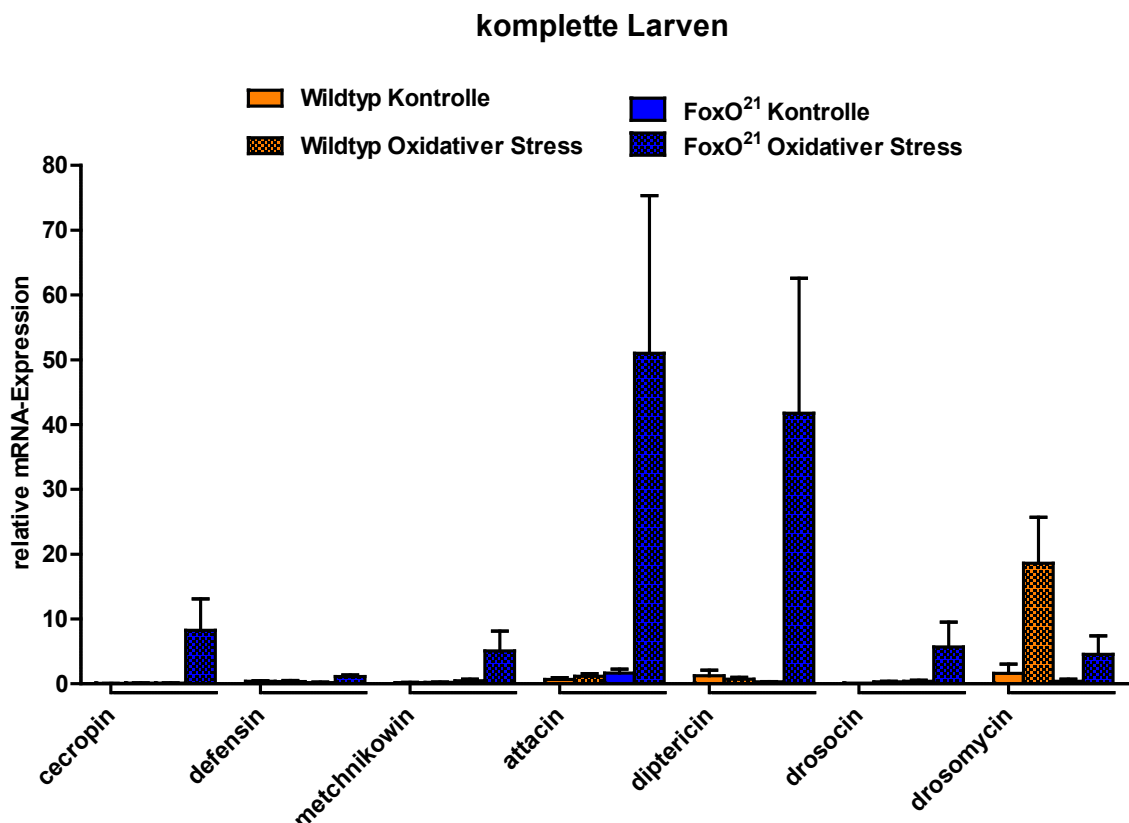
In dem hier präsentierten Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine künstlich induzierte Deaktivierung des Insulin/IGF-Signalweges, gleichermaßen zu einer Expressionszunahme der AMPs *attacin* und *drosomycin* führt, wie sie unter Hungerbedingungen beobachtet wurde. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit entsprechenden Beobachtungen von Becker *et al.* in adulten *Drosophila melanogaster* [102]. Ferner beschreibt eine Studie von Kramer *et al.*, dass eine FoxO-Überexpression bei *Drosophila*-Larven die Auswirkungen von Hunger nachstellt [101]. Unter Berücksichtigung dieser Publikationen führten die hier erbrachten Ergebnisse zu der Hypothese, dass Hungerstress durch die Konzentrationsabnahme der Insulinliganden den ILS-Weg deaktiviert. Das Ausbleiben der PI3K/Akt-regulierten FoxO-Phosphorylierung aktiviert den Transkriptionsfaktor FoxO, der die AMP-Transkription induziert.

#### 4.5 Oxidativer Stress induziert eine NF- $\kappa$ B-unabhängige AMP-Expression

In den in Kapitel 4.3 präsentierten Ergebnissen, wurde neben Hunger ein zweiter Stressor identifiziert, der das Potential einer AMP-Induktion aufwies, nämlich oxidativer Stress (Abb. 4.18). Die Behandlung von Wildtyp-Larven mit der ROS-bildenden Substanz

Paraquat hatte eine Expressionszunahme von *drosomycin* in ganzen Organismus (Abb. 4.18 A), sowie von *cecropin*, *defensin*, *attacin* und *drosomycin* in isolierten Atemwegsepithelzellen dieser Larven (Abb. 4.18 B) zur Folge. Anders als nach einer Hungerexposition konnte infolge von oxidativen Stress ausschließlich in larvalen Tracheen der FoxO-GFP-Reporter-Linie eine nukleäre Translokation detektiert werden. Die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Relish und Dorsal erfuhren keine Aktivierung (Abb. 4.4). Folglich kann daraus das Fazit gezogen werden, dass der nach oxidativem Stress beobachtete Anstieg der AMP-Expression ein Relish- und Dorsal-unabhängiger Prozess ist und somit nicht das Resultat der konventionellen Toll- und IMD-Signalwegaktivierung.

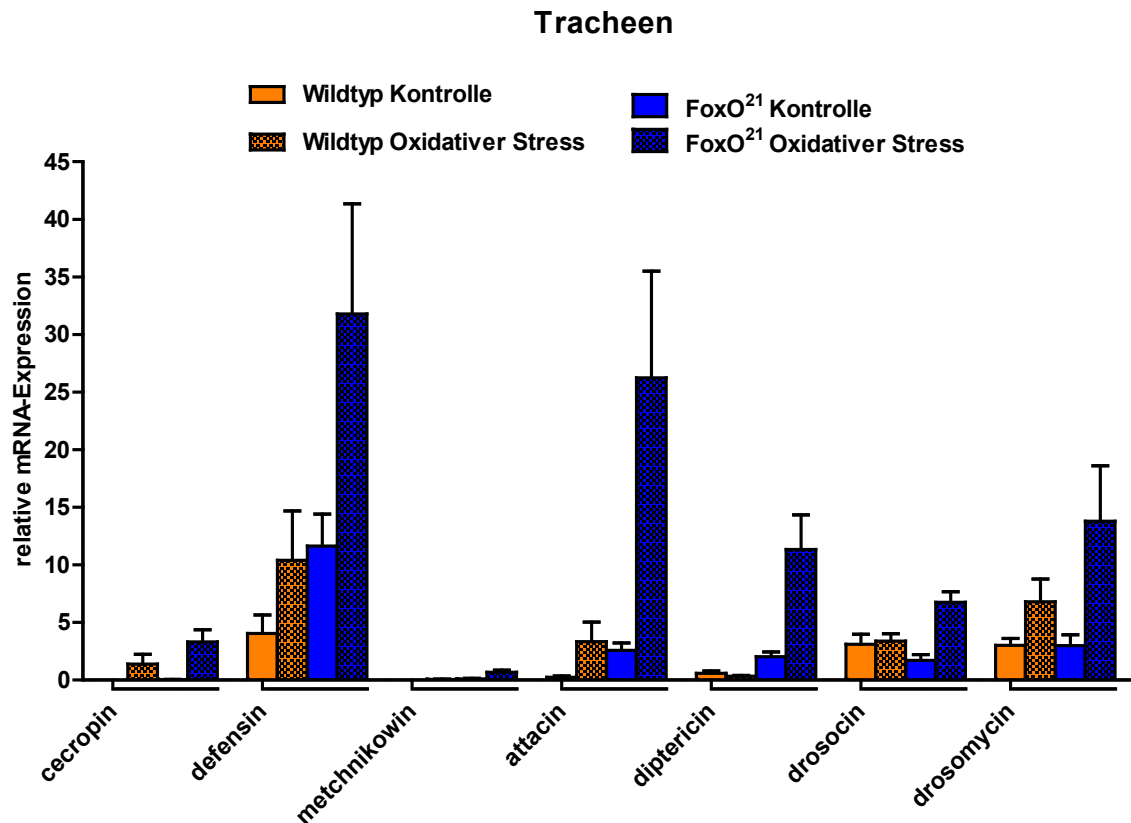
#### 4.5.1 Die durch oxidativen Stress induzierte Expression von Antimikrobiellen Peptid-Genen ist ein FoxO-unabhängiger aber FoxO-regulierter Prozess



**Abb. 4.27: FoxO-defiziente *Drosophila*-Larven antworten mit einer stärkeren AMP-Expression auf oxidativen Stress als Wildtyp-Larven**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Genen wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen in kompletten L3-Larven der Wildtyp-Linie Canton-S (orange Balken) sowie der FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup> (blaue Balken). In Larven der Wildtyp-Linie, die für zwei Stunden oxidativem Stress ausgesetzt waren, induziert durch 100 mM Paraquat, wurde eine vielfach erhöhte *drosomycin*-Expression gemessen. In Larven der FoxO-*knock out*-Linie wurde nach gleicher Behandlung eine starke Expressionszunahme aller sieben AMPs detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bzw. fünf unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=10 Larven.

Analog zu der in Kapitel 4.4.2 dargestellten Analyse der Hunger-induzierten AMP-Regulierung wurde im Folgenden der Transkriptionsfaktor FoxO als potentieller Induktor der durch oxidativen Stress ausgelösten AMP-Expression in den Fokus der Untersuchungen gestellt. Um dies zu eruieren, wurden Larven der FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup> oxidativem Stress ausgesetzt und ihre AMP-Expression quantifiziert.



**Abb. 4.28: Oxidativer Stress verursacht im respiratorischen Epithel FoxO-defizienter Larven eine stärkere AMP-Expression als im Gewebe von Wildtyp-Larven**

Die Expression der Antimikrobiellen Peptid-Gene wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rp113* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen im isolierten Tracheenepithel der Wildtyp-Linie Canton-S (orange Balken) sowie der FoxO-*knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup> (blaue Balken). In Tracheen von Wildtyp-Larven, die für zwei Stunden oxidativem Stress ausgesetzt waren, induziert durch 100 mM Paraquat, wurde eine erhöhte Expression der Gene *cecropin*, *defensin*, *attacin* und *drosomycin* gemessen. In Tracheen von FoxO-*knock out*-Larven wurde nach gleicher Behandlung eine vielfach stärkere Expression aller sieben AMPs detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei bzw. fünf unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste: n=50 Tracheen.

In der Abbildung 4.27 sind die relativen Expressionen aller sieben AMPs in kompletten Larven dargestellt. In Übereinstimmung mit der Darstellungsweise in Kapitel 4.4.2 geben orange Balken die Expression in Larven des Wildtypstamms Canton-S und blaue Balken die Expression in Larven der FoxO<sup>21</sup>-Linie wieder. Wie bereits beschrieben (Abb. 4.18 A) war im Gewebe kompletter Wildtyp-Larven *drosomycin* das einzige AMP-Gen, das durch oxidativen Stress in seiner Expression angeregt wurde (Abb. 4.27 - orange Balken). In FoxO-defizienten Larven (FoxO<sup>21</sup>) induzierte oxidativer Stress dagegen eine massive Hochregulierung aller sieben AMP-Gene (Abb. 4.27 - blaue Balken). Die Induktionen



variieren zwischen mäßig erhöht (6-14-fach) bei *defensin*, *drosomycin*, *metchnikowin* und *drosocin* und stark erhöht (30-145-fach) bei *attacin*, *cecropin* und *diphtericin* in Relation zur Expression in unbehandelten FoxO<sup>21</sup>-Larven.

Eine entsprechende, wenn auch in der Expressionshöhe schwächere, Induktion aller AMPs wurde in Tracheen von FoxO-*knock out*-Larven ermittelt (Abb. 4.28 - blaue Balken). AMPs, die in Wildtyp-Tracheen durch oxidativen Stress in ihrer Expression aktiviert wurden wie *cecropin*, *defensin*, *attacin* und *drosomycin* (Abb. 4.28 - orange Balken), wurden in gleicher Weise im Tracheenepithel der FoxO<sup>21</sup>-Larven induziert.

Oxidativer Stress aktiviert eindeutig andere zelluläre Prozesse als Hunger. Wie zuvor ausführlich demonstriert, induziert Hunger eine FoxO-Aktivierung, die direkt die Expression von *attacin* und *drosomycin* reguliert (Kapitel 4.4.2). Dies trifft für die durch oxidativen Stress induzierte AMP-Expression nicht zu (Abb. 4.27 und 4.28).

Angeichts der in den Abbildungen 4.4, 4.18, 4.27 und 4.28 veranschaulichten Resultate konnte das Fazit gezogen werden, dass oxidativer Stress die Expression einiger AMPs induziert. Diese wird offensichtlich nicht durch eine direkte Interaktion des FoxO-Proteins mit den AMP-Genen initiiert, sondern findet unabhängig von FoxO statt. Jedoch unterliegt der Prozess der ROS-induzierten AMP-Expression einer negativen Regulation durch den Transkriptionsfaktor FoxO, was durch das Ausschalten von FoxO unter Verwendung der *knock out*-Linie FoxO<sup>21</sup> demonstriert wurde. Zwei unterschiedliche hypothetische Mechanismen wären in der Lage die beobachteten Abläufe zu erklären (Abb. 5.2), auf denen die nachfolgenden Analysen basieren.

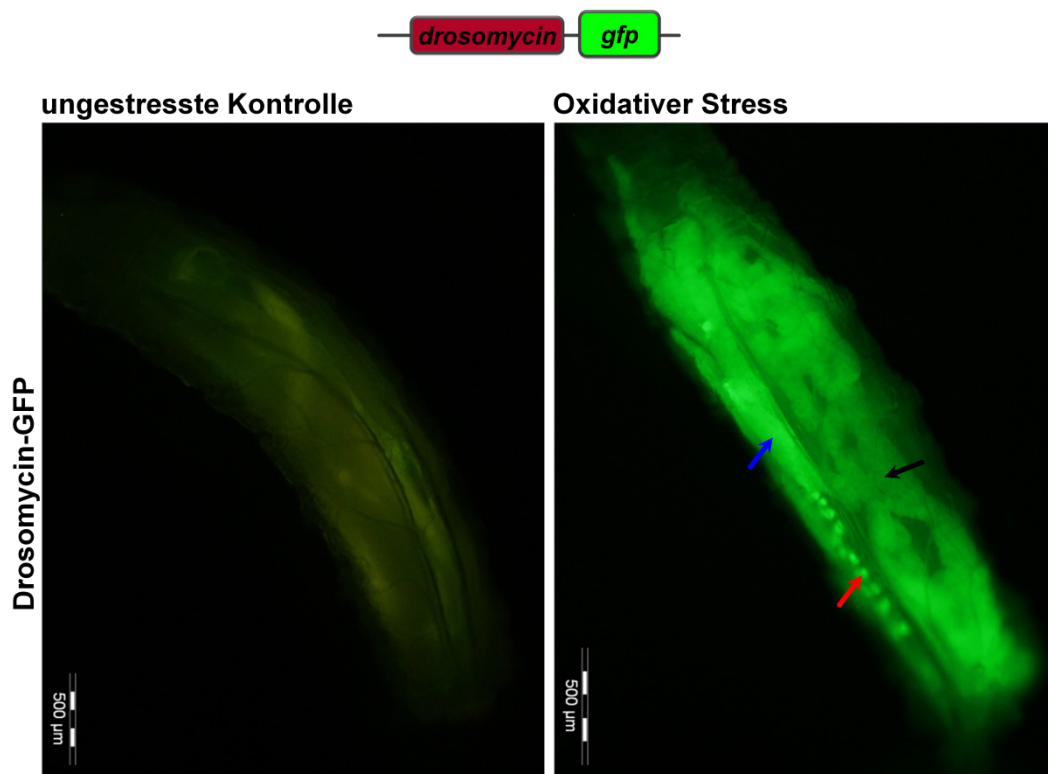
## 4.6 Identifikation der durch oxidativen Stress initialisierten zellulären Prozesse in der *Drosophila*-Larve

Mit dem übergeordneten Ziel der Aufschlüsselung der durch oxidativen Stress verursachten FoxO-Aktivierung und insbesondere der Regulation der AMP-Expression im Gewebe der *Drosophila*-Larve, ist es zunächst erforderlich die zellulären Vorgänge, die dem Einfluss von oxidativem Stress und ROS unterliegen, aufzudecken.

### 4.6.1 Oxidativer Stress induziert eine *drosomycin*-Expression im Fettkörper, Mitteldarm und in Perikardialen Zellen der *Drosophila*-Larve

Wie in den bisher geschilderten Versuchen konnte infolge von oxidativem Stress eine Zunahme der *drosomycin*-Expression sowohl im Homogenisat kompletter Larven, als auch im Epithel isolierter Tracheen gemessen werden (Abb. 4.18). Die Messung der Genexpression im Homogenisat macht eine differenzierte Zuordnung der Expression zu

bestimmten Organen unmöglich. Aus diesem Grund wurde unter Verwendung einer GFP-Reporterlinie die *drosomycin*-Expression *in vivo* lokalisiert (Abb. 4.29).



**Abb. 4.29: Lokalisierung der durch oxidativen Stress induzierten *drosomycin*-Expression in einer *Drosophila*-Larve**

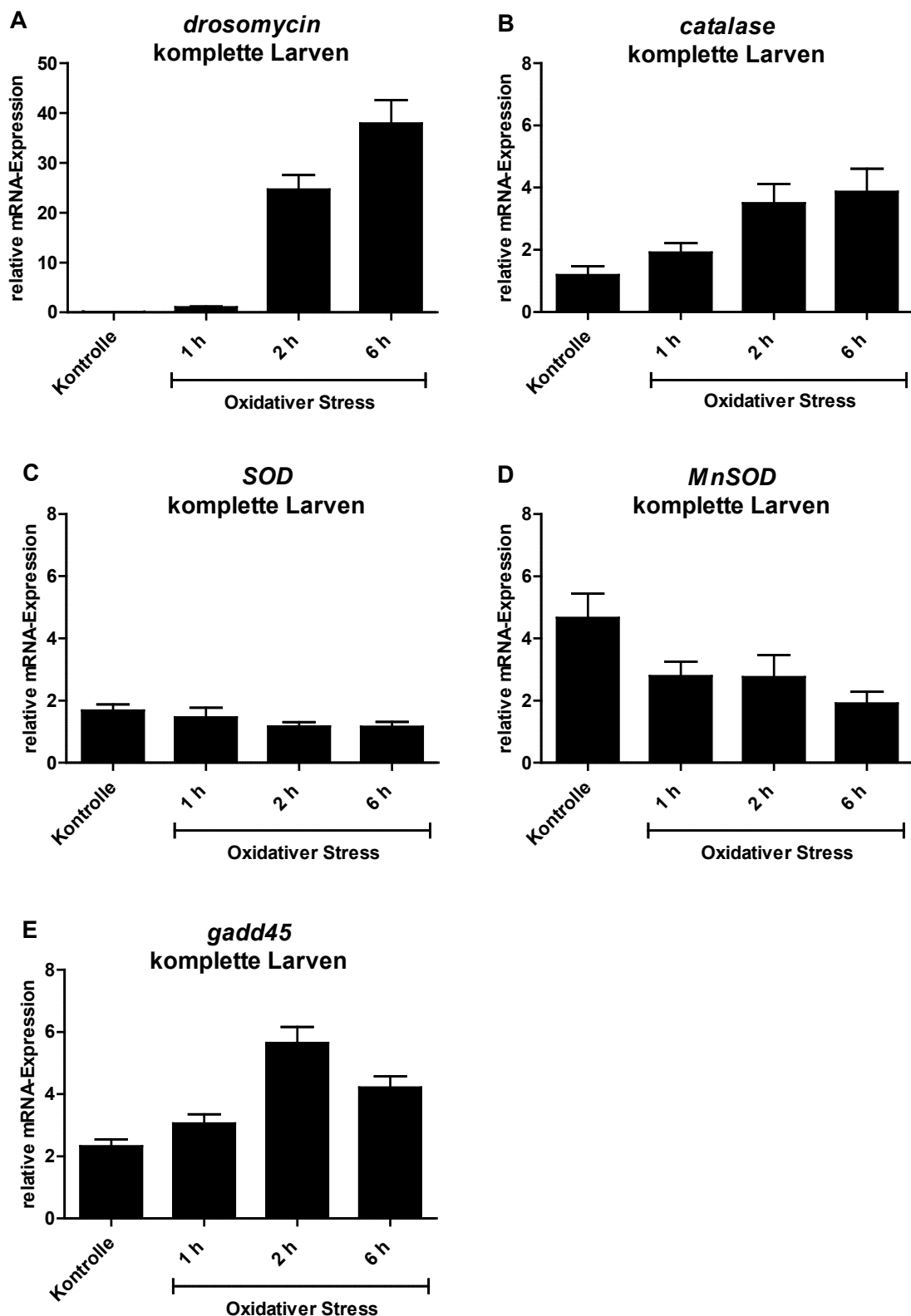
Mit Hilfe einer GFP-Reporterlinie, in der die GFP-Signalstärke mit der *drosomycin*-Promotoraktivität korreliert, wurden die Organe der stärksten *drosomycin*-Expression identifiziert. Nach 14 h im Paraquat-versetzten Medium [100 mM] war das stärkste GFP Signal im Fettkörper (schwarzer Pfeil) im Mitteldarm (blauer Pfeil) und in den Perikardialen Zellen (roter Pfeil) von L3-Larven zu beobachten. Kontroll-Tiere wurden unter gleichen Bedingungen ohne Paraquat-Zusatz gehalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel, aus drei unabhängigen Versuchen (n=25 Larven).

In der hier verwendeten Reporterlinie steht die GFP-Expression unter der transkriptionellen Kontrolle des *drosomycin*-Promotors. Demzufolge visualisiert das GFP-Signal Gewebe, in denen eine *drosomycin*-Expression stattgefunden hat. Während in Larven, die unter Normalbedingungen gehalten wurden, ein nur marginales GFP-Signal detektiert wurde, konnten in Larven nach einer 14-stündigen Paraquat-Exposition eindeutig Organe mit verstärkter *drosomycin*-Aktivität definiert werden. Eine starke ROS-bedingte *drosomycin*-Expression wurde im gesamten Fettkörper der Larve (Abb. 4.29 - schwarzer Pfeil), im Mitteldarm (Abb. 4.29 - blauer Pfeil) und in den das Herz flankierenden Perikardialen Zellen (Abb. 4.29 roter Pfeil) detektiert.

#### 4.6.2 Oxidativer Stress induziert die Expression einiger ROS-protectiver Gene

ROS sind nicht von vorn herein mit oxidativem Stress gleichzusetzen. Sie sind nicht nur ein wichtiger Mediator vieler zellulärer Prozesse, sondern darüber hinaus auch ein natürliches Nebenprodukt der mitochondrialen Energieproduktion, weshalb sie permanent in der Zelle präsent sind [59]. Unter normalen Umständen wird durch die zelleigene Homöostase eine Balance zwischen ROS-Produktion und Detoxifizierung aufrechterhalten, um die Zelle vor Schäden zu schützen. Gerät diese Balance aus dem Gleichgewicht und reichern sich ROS in der Zelle an, spricht man von oxidativem Stress. Dies kann intrazellulär begründet sein, entweder durch eine Abnahme der Antioxidantien oder Zunahme der ROS-Produktion oder aber durch eine extrazelluläre Quelle, wie beispielsweise eine Paraquat-Exposition [61]. In der Zelle geht Paraquat eine Redox-Reaktion ein. Bei der Oxidation des freien Paraquat-Radikals wird  $O_2$  zu dem reaktiven Superoxid-Radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) reduziert. Folglich sind durch Paraquat generierte ROS in der Zelle in erster Linie Superoxid-Radikale, durch weitere Reaktionen entstehen des Weiteren  $H_2O_2$  und Hydroxylionen ( $^{\bullet}OH$ ). Oxidativer Stress aktiviert unterschiedliche antioxidative Enzyme, die spezifisch für den Abbau dieser reaktiven Sauerstoffverbindungen sind. Superoxiddismutase (SOD) und die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) konvertieren Superoxid-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Dieses wird durch die Wirkung des Enzyms Catalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut [59]. Neben der Detoxifikation aktiviert oxidativer Stress in der Zelle Gene, die einen Stopp der Zellproliferation, Reparatur von DNA-Schäden, Überlebensprozesse oder Apoptose implizieren. Diese Gene werden zur Familie der *gadd45*-Gene zusammengefasst (*growth arrest DNA damage 45*) [47].

Um die detoxifizierenden Maßnahmen in *Drosophila* als Antwort auf oxidativen Stress zu beleuchten, wurden Larven des Wildtypstammes  $w^{1118}$  im Paraquat-versetzten Medium gehalten. In Anlehnung an aktuelle Literatur wurde im Gewebe dieser Larven die Expression einer Gruppe von Antioxidans-Genen (*catalase*, *SOD* und *MnSOD*) gemessen, die als FoxO-regulierte Gene beschrieben wurden [59],[64]. Parallel zur Detektion der *SOD*, *MnSOD*, *catalase* und *gadd45*-Expression wurde die *drosomycin*-Expression in diesen Proben quantifiziert (Abb. 4.30 A-E). In Übereinstimmung mit allen bisher erbrachten Ergebnissen war auch in diesen Larven eine proportional zur Stressdauer ansteigende *drosomycin*-Expression zu beobachten. Sie nahm nach 1 h den 15-fachen und nach 6 h den 530-fachen Wert an, verglichen mit der relativen Expression in unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 4.30 A). Alle weiteren in Abb. 4.30 dargestellten Messergebnisse geben die Expressionsniveaus zuvor genannter Gene in gleichen Proben wieder.



**Abb. 4.30: Expressionen von *drosomycin* und Genen einer ROS-induzierten Stressreaktion in Abhängigkeit von der Stressdauer**

Die Expression der Gene *drosomycin*, *catalase*, *SOD*, *MnSOD* und *gadd45* wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen im Homogenisat kompletter L3-Larven des Wildtypstammes  $w^{1118}$ . Oxidativer Stress wurde durch Beimischung von Paraquat [100 mM] ins Medium induziert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel / Mittelwert zweier technischer Replikate  $\pm$  SD. Ein biologisches Replikat umfasste:  $n=10$  Larven.

Im Gewebe der Paraquat-behandelten Larven konnte ein proportional zur Dauer der Stressexposition verlaufender Anstieg der *catalase*-Expression detektiert werden (Abb. 4.30 B). In den gleichen Proben konnte jedoch keine Expressionszunahme der Superoxiddismutase-Gene *SOD* und *MnSOD* beobachtet werden (Abb. 4.30 C und D). Insbesondere die *MnSOD*-Expression wies einen Rückgang während oxidativer Stressexposition auf. Die *gadd45*-Expression wies ein sehr uneinheitliches Muster auf, mit einem anfänglichen Expressionsanstieg in den ersten zwei Stunden der Stressexposition und einem anschließenden Rückgang nach 6 h (Abb. 4.30 E). Zusammengefasst haben die in der Abbildung 4.30 dargestellten Ergebnisse bestätigt, dass das in dieser Arbeit eingesetzte oxidative Stressstimulans Paraquat auch Gene der Stressantwort wie *catalase* und *gadd45* aktiviert. Die Expression anderer Antioxidantien (*SOD* und *MnSOD*) wurden hingegen unter Paraquat-Exposition nicht reguliert.

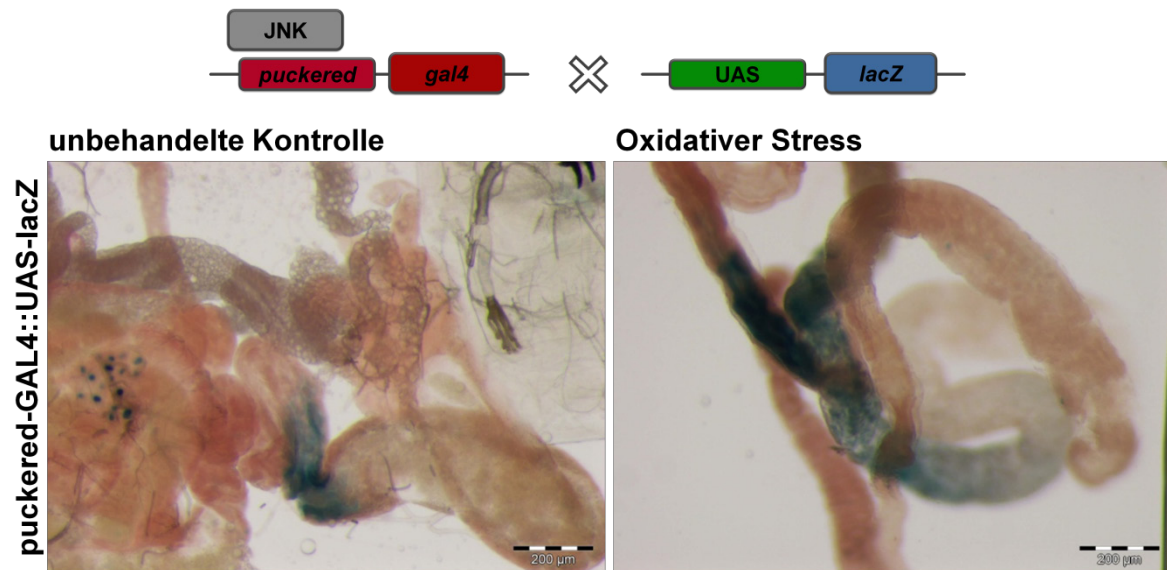
#### 4.6.3 Oxidativer Stress aktiviert den JNK-Signalweg

In Verlauf von Kapitel 4.5 wurden mehrere Fragen aufgeworfen, die die durch oxidativen Stress induzierte AMP-Aktivierung und die Rolle, die der Transkriptionsfaktor FoxO dabei erfüllt, betreffen. Im Folgenden wurden Signaltransduktionskaskaden identifiziert, die in *Drosophila*-Larven durch oxidativen Stress aktiviert werden.

Zahlreiche Studien des letzten Jahrzehnts beschreiben den JNK-Signalweg als einen der Signalwege, die durch oxidativen Stress eine Aktivierung erfahren [41],[42],[50]. Insbesondere unter Berücksichtigung des Aspektes, dass FoxO ein Zielprotein der ROS-abhängigen Phosphorylierung durch die Jun-Kinase (Basket/JNK) ist [50], wurde unter Zuhilfenahme des JNK-Reporters *puckered*-GAL4::UAS-lacZ die Aktivierung des JNK-Signalweges als Antwort auf oxidativen Stress in *Drosophila*-Larven untersucht.

Als *read-out* für die Aktivierung des JNK-Signalweges wurde die Expression des JNK-Zielgens *puckered* gewählt [41],[52]. Dieses kodiert die MAPK Phosphatase, welche infolge einer negativen Rückkopplung mit der Jun-Kinase (Basket) interagiert. Auf diese Weise reguliert das Produkt des Gens *puckered* die Aktivität des JNK-Weges und auch die eigene Expression. Die Expression dieses Gens und somit die Aktivität seines Promotors ist ein direkter Indikator für die Aktivität des JNK-Weges. Unter Zuhilfenahme des im Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen GAL4/UAS-Expressionssystems wurde die *puckered*-Promotoraktivität durch die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bzw. die Entstehung eines blauen Spaltproduktes visualisiert.

In Larven der *puckered*-GAL4::UAS-lacZ-Reporterlinie, die einer zweistündigen Paraquat-Behandlung ausgesetzt waren, konnte eine JNK-Aktivität ausschließlich im anterioren Abschnitt des Mitteldarmes nachgewiesen werden (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31: Visualisierung der durch oxidativen Stress induzierten JNK-Signalweg-Aktivierung im Gastrointestinaltrakt einer *Drosophila*-Larve**

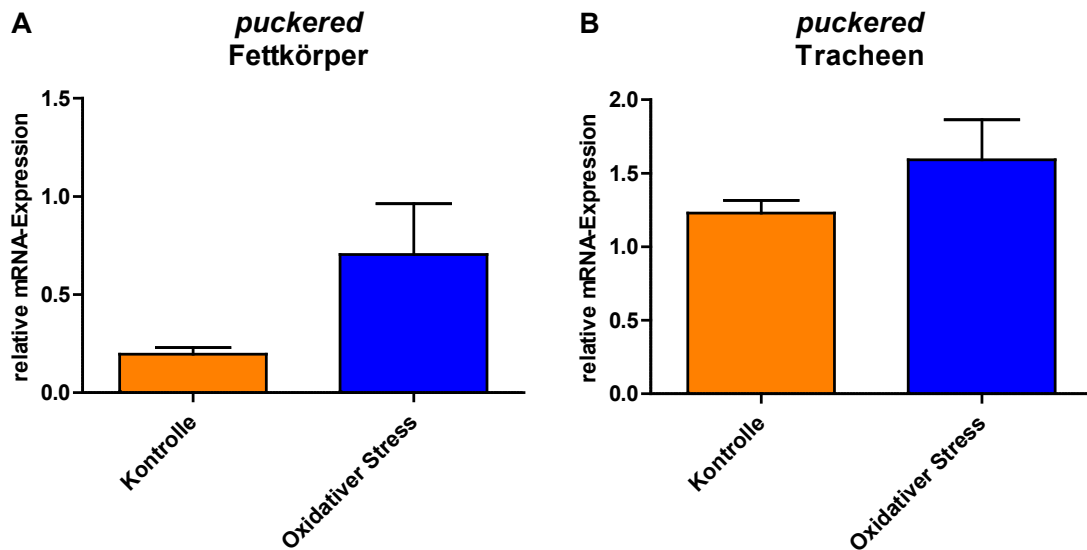
In der *puckered*-GAL4::UAS-*lacZ*-Reporterlinie korreliert die Intensität der blauen Färbung mit der Promotoraktivität des *puckered*-Gens. Da es sich dabei um ein JNK-Zielgen handelt, diente die *puckered*-Expression als *read-out* für die Aktivität des JNK-Signalweges. In L3-Larven, die für zwei Stunden im Paraquat-versetzten Medium [100 mM] gehalten wurden, konnte eine Aktivierung des *puckered*-Promotors ausschließlich in einer Region des Mitteldarmes detektiert werden.

Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen ohne Paraquat-Zusatz gehalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel, aus drei unabhängigen Versuchen (n=25 Larven).

Ferner wurde mittels *real-time* PCR die Expression von *puckered* und eines zweiten JNK-Zielgens *ATG18.2* [41] analysiert. Sowohl im Fettkörper als auch in Tracheenepithel von Wildtyp-Larven ( $w^{1118}$ ) konnte eine durch oxidativen Stress induzierte Heraufregulierung der *puckered*- (Abb. 4.32) und der *ATG18.2*-Expression (Abb. 4.33) detektiert.

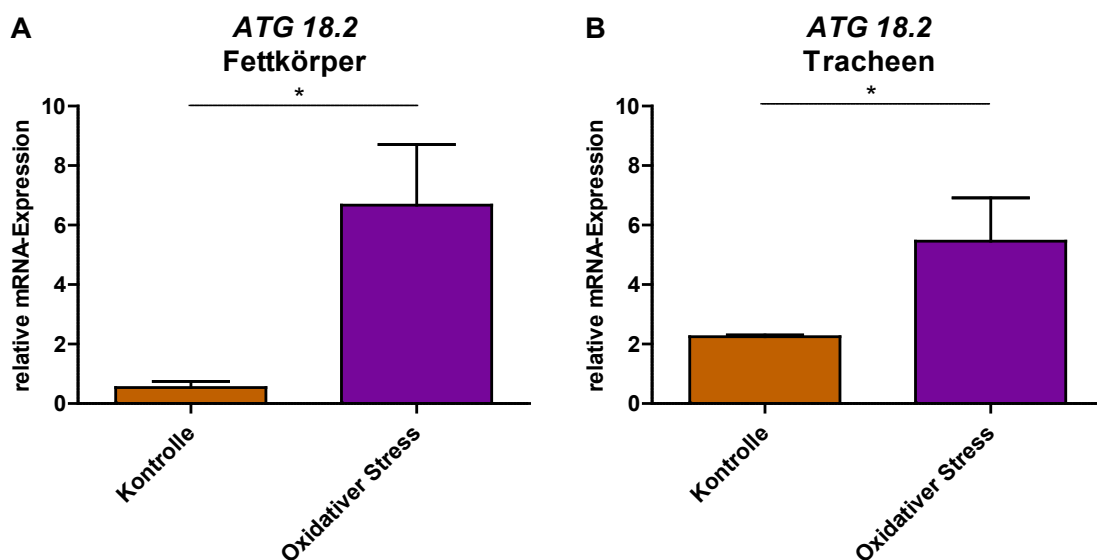
Wie bereits bei der in Abb. 4.18 dargestellten Quantifizierung der AMP-Expression, wies die *puckered*- und *ATG18.2*-Expression im Tracheengewebe eine geringere Zunahme als im Fettkörper auf, was jedoch durch das unterschiedliche immunologische Potential dieser beiden Organe zu erklären ist. Der eindeutige Expressionsanstieg der JNK-Zielgene in Paraquat-exponierten Larven führt zu der Schlussfolgerung, dass oxidativer Stress in *Drosophila*-Larven den JNK-Signalweges aktiviert.





**Abb. 4.32: Oxidativer Stress induziert die Expression des JNK-Zielgenes *puckerred* im Fettkörper und Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

Die Expression des JNK-Zielgenes *puckerred* wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen *puckerred*-mRNA-Expressionen im Fettkörper (A) und Tracheengewebe (B) isoliert aus L3-Larven der Wildtyp-Linie  $w^{1118}$ . Orange Balken geben die *puckerred*-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Blaue Balken zeigen die *puckerred*-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven, die für zwei Stunden oxidativem Stress ausgesetzt waren, induziert durch 100 mM Paraquat. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste:  $n=10$  Fettkörper bzw.  $n=50$  Tracheen.



**Abb. 4.33: Oxidativer Stress induziert die Expression des JNK-Zielgenes *ATG18.2* im Fettkörper und Atemwegsepithel von Wildtyp-Larven**

Die Expression des JNK-Zielgenes *ATG18.2* wurde in einer *real-time* PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *rpl13* verwendet. Dargestellt sind die relativen *ATG18.2*-mRNA-Expressionen im Fettkörper (A) und Tracheengewebe (B) isoliert aus L3-Larven der Wildtyp-Linie  $w^{1118}$ . Braune Balken geben die *ATG18.2*-Expressionsniveaus im Gewebe unbehandelter Kontrolltiere wieder. Violette Balken zeigen die *ATG18.2*-Expressionsniveaus im Gewebe von Larven, die für zwei Stunden oxidativem Stress ausgesetzt waren, induziert durch 100 mM Paraquat. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM. Ein biologisches Replikat umfasste:  $n=10$  Fettkörper bzw.  $n=50$  Tracheen. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



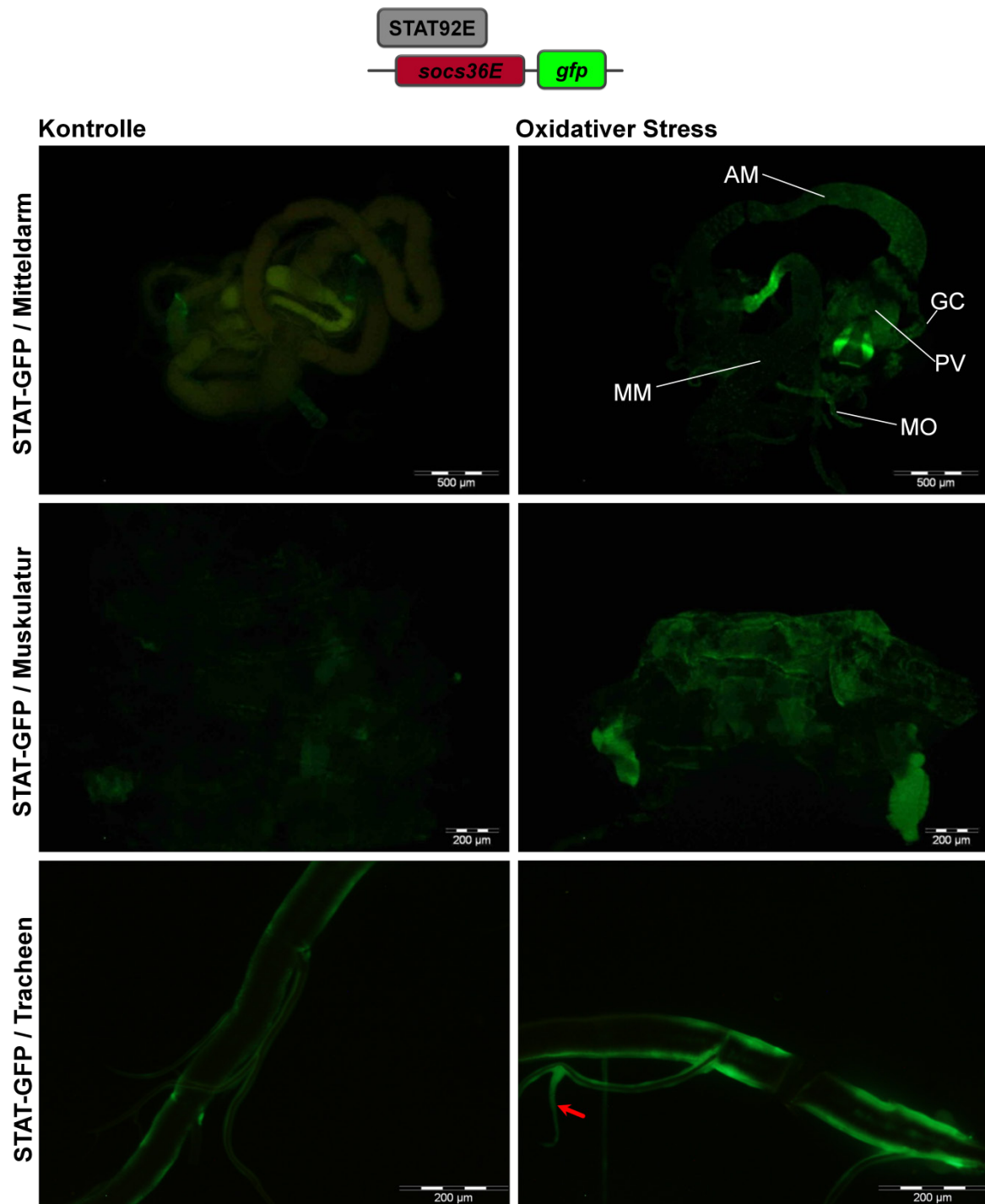
#### 4.6.4 Oxidativer Stress aktiviert den Jak/STAT-Signalweg

Ein weiterer Signalweg, dessen Beteiligung an der durch oxidativen Stress ausgelösten zellulären Reaktion verifiziert werden konnte, war der Jak/STAT-Signalweg.

Der Jak/STAT-Signalweg ist in erster Linie eine wichtige Komponente der Regulation der Zellentwicklung und Proliferation sowie der Homöostase [56],[115]. Wenngleich bisher wenig über die Beteiligung des Jak/STAT-Weges an der Stressantwort bekannt ist, wird dieser Signalweg neben JNK- und den beiden NF- $\kappa$ B-Kaskaden zu den vier wichtigsten Signalwegen des angeborenen Immunsystems der Taufliege gezählt [32]. Wie bereits bei der Analyse der JNK-Signalweg-Aktivierung durch oxidativen Stress, wurde auch bei der Charakterisierung des Jak/STAT-Weges eine Reporter-Linie eingesetzt. Die hier verwendete Fliegen-Linie, die im Folgenden als STAT-GFP bezeichnet wird, verfügt über STAT92E-Bindedomänen, die aus einem STAT92E-Zielgen - *socs36E* - stammen und dem *gfp*-Gen vorgeschaltet wurden [152]. Interagiert der Transkriptionsfaktor STAT92E mit seinen korrespondierenden DNA-Sequenzen, wird die Expression des *gfp*-Gens induziert. Auf diese Weise dient die GFP-Fluoreszenz als direkter Indikator für die Aktivität von STAT92E und erlaubt eine *in vivo*-Visualisierung der Jak/STAT-Signalweg-Aktivierung. Hierzu wurden Larven für 24 h dem Einfluss der ROS-generierenden Substanz Paraquat ausgesetzt. Um die Intensität des GFP-Signals in einzelnen Organen differenziert zu betrachten, wurden diese isoliert (Abb. 4.34). Eine ROS-induzierte Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges wurde einzig im Mitteldarm, in der Muskulatur und im Tracheenepithel der Larven detektiert (Abb. 4.34).

Im Mitteldarm konnte in allen Abschnitten des Organs eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Regionen der stärksten Aktivierung waren der Proventrikulus (PV), der anteriore Mitteldarm (AM) inklusive der als *gastric caeca* (GC) bezeichneten blind endenden Fortsätze, sowie die Malpighischen Organe (MO).

Des Weiteren wurde in der dicht unter der Kutikula angeordneten Muskulatur der Larve eine Aktivierung des Jak/STAT-Weges nachgewiesen und letztlich auch im trachealen Epithel sowohl der primären Tracheenstränge als auch der sekundären Verzweigungen. Neben dem Tracheenepithel wurde infolge von oxidativem Stress der Jak/STAT-Signalweg in Stammzellansammlungen entlang sekundärer Tracheenäste, den sogenannten Tracheoblasten, detektiert (Abb. 4.34 - roter Pfeil). In allen anderen Organen konnte keine Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges festgestellt werden.



**Abb. 4.34: Visualisierung der durch oxidativen Stress induzierten Jak/STAT-Signalweg-Aktivierung in Organen einer *Drosophila*-Larve**

Mit Hilfe einer STAT-GFP-Reporterlinie, in der die Aktivität der Bindedomäne des Jak/STAT-Zielgens *socs36E* durch die Expression von *gfp* visualisiert wird, wurde die Aktivierung des Signalweges durch oxidativen Stress untersucht. In L3-Larven, die für 24 h im Paraquat-versetzten Medium [100 mM] gehalten wurden, konnte eine Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges im Mitteldarm, in der Muskulatur sowie im Tracheenepithel detektiert werden. Des Weiteren induzierte oxidativer Stress eine Aktivierung des Signalweges in Stammzellinseln der Tracheen, den Tracheoblasten (roter Pfeil).

Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen ohne Paraquat-Zusatz gehalten. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel, aus drei unabhängigen Versuchen (n=25 Larven).

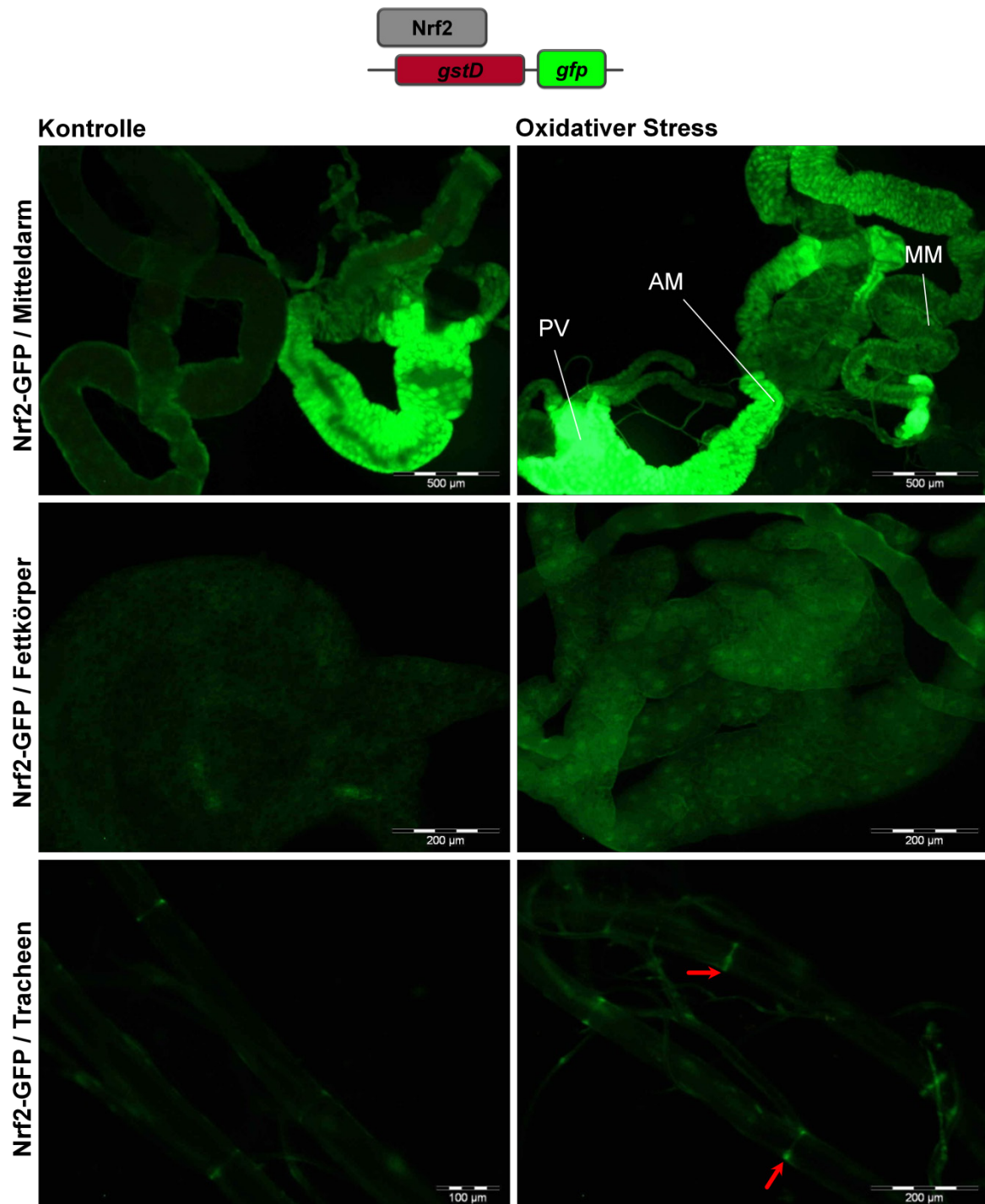
Bisher konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zwar nicht die beiden Hauptwege des angeborenen Immunsystems (IMD- und Toll-Signalweg) aktiviert (Abb. 4.4), dennoch löste der Stressor eine Immunantwort in *Drosophila* aus, die sich durch die Expression

des Antimikrobiellen Peptides *drosomycin* manifestierte (Abb. 4.18). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass zwei andere Signalwege der Taufliege durch oxidativen Stress aktiviert werden, nämlich der JNK- und der Jak/STAT-Reaktionsweg.

#### 4.6.5 Oxidativer Stress aktiviert den Keap1-Nrf2-Signalweg

Zusätzlich zu der in den Kapiteln 4.6.3 und 4.6.4 präsentierten JNK- und Jak/STAT-Regulierung konnte ein dritter wichtiger Reaktionsweg identifiziert werden, dessen Aktivität durch oxidativen Stress induziert wird. Dabei handelte es sich um den Keap1-Nrf2-Signalweg [67]. Nrf2 ist ein Vertreter der Cap-n-collar (Cnc) Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren stellen eine Gruppe hochkonservierter Proteine dar, die essentielle entwicklungsbiologische Funktionen erfüllen und bei Konfrontation mit Umweltstressoren zur Erhaltung der Homöostase beitragen [66],[77]. Um die Aktivierung des Keap1-Nrf2-Signalweges zu analysieren, wurde eine Nrf2-GFP-Reporterlinie verwendet. Entsprechend der STAT-GFP-Linie, wird auch bei der Nrf2-GFP-Linie die Regulation des Nrf2-Transkriptionsfaktors stellvertretend durch die Aktivierung Nrf2-spezifischer DNA-Sequenzen eines Nrf2-Zielgenes ermittelt (hier des Gens der Glutathion-S-Transferase *gstD*). Somit exprimiert die hier eingesetzte Reporterlinie *gfp* unter der transkriptionellen Kontrolle einer *gstD*-Promotorregion, die mehrere als ARE bezeichnete Konsensussequenzen (Nrf2-Bindedomänen) enthält [66]. Eine Zunahme im GFP-Signal korreliert demzufolge direkt mit der Aktivität des Nrf2-Transkriptionsfaktors und erlaubt somit eine *in vivo*-Analyse der Keap1-Nrf2-Signalweg-Aktivierung.

Bereits in Tieren, die keinem Stressor ausgesetzt waren, wurde eine Keap1-Nrf2-Aktivität beobachtet, insbesondere im Proventrikulus (PV) und im anterioren Mitteldarm (Abb. 4.35). Nach 24 h unter dem Einfluss der ROS-generierenden Substanz Paraquat wurde eine eindeutige Zunahme des GFP-Signals im Mitteldarm, Fettkörper und im Tracheenepithel der Larven (Abb. 4.35) registriert. Im Mitteldarm war dies in allen Abschnitten des Organs der Fall. Regionen der stärksten Aktivierung waren der anteriore (AM) und mittlere Mitteldarm (MM), insbesondere in den Enterozyten des vorderen Abschnittes konnte eine durch oxidativen Stress verursachte Nrf2-Aktivität verzeichnet werden. Im Gegensatz zu Jak/STAT- wurde der Keap1-Nrf2-Signalweg im Fettkörper Paraquat-exponierter Larven aktiviert, nicht jedoch in der Muskulatur (Abb. 4.34). Des Weiteren konnte eine GFP-Expressionszunahme im Tracheenepithel detektiert werden, dabei insbesondere im Epithel der sekundären und tertiären Tracheenäste, sowie in Stammzellansammlungen der Primärstränge (Abb. 4.35 - roter Pfeil).



**Abb. 4.35: Visualisierung der durch oxidativen Stress induzierten Keap1-Nrf2-Signalweg-Aktivierung in Organen einer *Drosophila*-Larve**

Mit Hilfe einer GFP-Reporterlinie, in der die Aktivität des Nrf2-Zielgenes *gstD* an GFP gekoppelt ist, wurde die Aktivierung des Signalweges durch oxidativen Stress untersucht. In L3-Larven, die für 24 h im Paraquat-versetzten Medium [100 mM] gehalten wurden, konnte eine Aktivierung des Keap1-Nrf2-Signalweges im Mitteldarm, im Fettkörper sowie im Tracheenepithel detektiert werden. Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen ohne Paraquat-Zusatz gehalten. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel, aus drei unabhängigen Versuchen (n=25 Larven).

Neben dem JNK- und Jak/STAT-Signalweg konnte also ein dritter Signalweg, der Keap1-Nrf2-Weg identifiziert werden, der infolge von oxidativem Stress im Gewebe von *Drosophila*-Larven eine Aktivierung erfährt. Diese Ergebnisse können nun als Basis für weiterführende Analysen einer ROS-induzierten FoxO- und AMP-Regulation dienen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxO für die Entwicklung und Morphologie der larvalen Atemorgane

Seit der erstmaligen Beschreibung der Forkhead Box-Transkriptionsfaktoren durch Weigel und Jäckle Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts [92], rückten insbesondere drei der 18 heute bekannten Klassen [93] ins Zentrum der Forschung: 1) die FoxA Familie, die wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung, Organogenese und dem Metabolismus erfüllen [116], 2) die FoxP Gruppe, Regulatoren der Entwicklung des Nervensystems und der Immunantwort [117] und 3) die FoxO Familie, die verschiedenste Funktionen abdecken, zu denen Apoptose, Redox-, Energie- und Immun-Homöostase sowie Zellzyklus-Abläufe gehören [94].

Eine eingehende Analyse der funktionellen Bedeutung des FoxO-Proteins für die Homöostase- und insbesondere die Stressregulation im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* standen im Zentrum dieser Dissertation. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden phänotypische Veränderungen in larvalen Tracheen in Abhängigkeit von einer FoxO-Manipulation untersucht (Kapitel 4.1). Die Manipulation bestand in einer Tracheenspezifischen Überexpression des Transkriptionsfaktors (UAS-FoxO) sowie der konstitutiv aktiven Form (UAS-FoxO<sup>TM</sup>) und in einem generellen FoxO-*knock out*, auf den im späteren Verlauf dieses Abschnitts eingegangen wird.

#### 5.1.1 Induzierte FoxO-Expression in larvalen Tracheen

Ein erster Effekt, der sich infolge einer FoxO-Überexpression manifestierte, betraf larvale Verhaltensmuster. Larven der Taufliege *Drosophila* weisen stereotype Migrationsverhalten auf. Bei optimalen Lebensbedingungen erfolgt die Eiablage auf der Oberfläche eines geeigneten Nährmediums. Nach dem Schlupf verbleiben Larven für wenige Stunden auf der Oberfläche, bevor sie sich in das Medium graben. Dieses verlassen sie erst unmittelbar vor dem Eintritt in die Metamorphose. Abweichungen von diesem Verhaltensmuster sind ein direkter Hinweis auf Störungen, die auf das Tier wirken. Nährstoffmangel beispielsweise induziert ein ungerichtetes, exploratives Futtersuchverhalten [118]. FoxO-überexprimierende Larven (UAS-FoxO und UAS-FoxO<sup>TM</sup>) verließen jedoch das Medium bereits in frühen Entwicklungsstadien und wiesen eine gezielte nach oben gerichtete Migration entlang der Gefäßwände auf (Meidverhalten). Dieses Verhalten entsprach exakt demjenigen, dass Larven unter Hypoxie zeigen [119].



Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die Larven hypoxische Bedingungen erfuhren. Die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen umfassten die Tracheenstruktur, Flüssigkeitsinfiltration, Epithelverdickung und Melanisierung (Abb. 4.1). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um sekundäre Effekte, die durch FoxO-induzierte Remodellierung des Epithels induziert werden (Abb. 4.1 C). Eine Verdickung des einschichtigen Epithels beeinflusst die luminal lokalisierte Kutikula. Demzufolge kann diese epitheliale Modifikation die beobachteten Strukturveränderungen durchaus erklären. Gleichzeitig liefert diese Hypothese eine Erklärung für die Flüssigkeitsansammlungen im Innern der Tracheen (Abb. 4.1 B und C). Denn neben der formgebenden Funktion dient die wasserdichte Kutikula als Begrenzung des luftgefüllten Tracheenlumens, um dennoch eine Diffusion der Gase zu sichern, ist diese sehr fein und anfällig für mechanische Beschädigung. Die Folge kann eine Infiltration der Hämolymphe aus der Körperhöhle oder der angrenzenden Epithelschicht sein.

In der Literatur wird FoxO als negativer Regulator sowohl des Zellwachstums als auch der Größe beschrieben. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors geht mit einer Reduktion der Zellgröße bzw. des Gewebes einher, was einer Inhibition des Insulinsignalwegs entspricht [109],[101]. Eine entsprechende Verkleinerung des respiratorischen Epithels wurde in den hier präsentierten Versuchen jedoch nicht beobachtet. Stattdessen führte die konstitutive Aktivierung zu einer Größenzunahme des Epithels. Dabei kann jedoch nicht differenziert werden, ob es sich dabei um eine Hyperplasie oder Hypertrophie des einschichtigen Epithels handelt. Weiterführend kann die konstitutive FoxO-Induktion zur Manifestation von Tumoren führen [121],[95], was die Bezeichnung von FoxO als Tumorsuppressor rechtfertigt.

Einen nicht-mechanischen zentrierten Erklärungsansatz für die Flüssigkeitsinfiltration in das Tracheenlumen liefern neue Studien zur trachealen Organogenese unter der Beteiligung des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor*) und des MAPK-Signalweges (*mitogen-activated protein kinase*) [122]. EGFR ist in erster Linie für den Prozess der Tracheendifferenzierung während der Embryonalentwicklung verantwortlich [120] aber auch für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität [122]. Eine Tracheen-spezifische Überexpression des zytoplasmatischen FoxO (UAS-FoxO), resultierte trotz eines deutlich geringer ausgeprägten Remodellings dennoch in einer offensichtlichen Permeabilität der Tracheen, die sich durch partielle Flüssigkeitsansammlungen im Innern der Tracheen abzeichnete (Abb. 4.1 B). FoxO wurde bisher nicht als Komponente des EGFR/MAPK-Signalweges beschrieben, korreliert aber sowohl mit der Aktivierung des EGFR als auch mit dem MAPK-Signalweg. Der EGF-Rezeptor aktiviert PI3K/Akt, wodurch FoxO inhibiert

wird. Der MAPK-Signalweg ist eine der Signaltransduktionskaskaden, die eine Polyubiquitinierung des FoxO-Proteins und somit seine proteasomale Degradierung herbeiführen [121],[122]. Eine FoxO-Überexpression könnte dem herkömmlichen EGFR/MAPK-Ablauf demnach entgegen wirken. Auf diese Weise könnte es zu einem Verlust der Gewebsintegrität und einer verringerte Zelladhäsion kommen, die die beobachtete Permeabilität der Tracheen sowohl in FoxO- als auch FoxO<sup>TM</sup>-exprimierenden Larven erklärt.

Die dritte überaus interessante morphologische Veränderung war die partielle Melanisierung der Tracheen. Die Melanisierung der Insekten ist nicht nur ein akuter Abwehrmechanismus gegen invadierende Pathogene, sondern auch ein klassischer Wundheilungsmechanismus, bei dem durch die Aktivierung einer Proteasekaskade unter Beteiligung einer Phenoloxidase Dopamin zu Melanin konvertiert wird. Das Melanin lagert sich direkt an der Gewebsverletzung ab und fördert auf noch nicht genauer charakterisierte Weise die Wundheilung. Des Weiteren bekämpft es eine Infektion, indem Mikroorganismen sequestriert und ihre Ausbreitung unterbunden wird, was u.a. durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgen könnte (ROS) [17]. Auf eine direkte Beteiligung des FoxO-Proteins am Melanisierungsprozess gibt es bisher keinerlei Hinweise. Und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Melanisierung ausschließlich an massiv deformierten Tracheenarealen beobachtet wurde (Abb. 4.1 B), ist es wahrscheinlich, dass es sich um eine sekundäre Folge der FoxO-induzierten Gewebsschädigung handelt.

### 5.1.2 Die Auswirkung von FoxO-Defizienz

Die Larven der FoxO<sup>21</sup>-Linie, obwohl infolge einer Punktmutation im Tryptophan-Kodon in allen Stadien ihres Lebenszyklus unfähig zur Bildung eines kompletten FoxO-Proteins, sind uneingeschränkt lebensfähig, von normaler Größe und unterschieden sich weder in ihrer phänotypischen Erscheinung noch in ihrer Entwicklung oder in ihrem Verhalten von Wildtyp-Tieren (Abb. 4.1 D). Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass FoxO keine essentielle Funktion während der Embryonalentwicklung der Fliege und auch nicht bei der Organogenese der Tracheen einnimmt.

Dieser Wildtyp-ähnliche Phänotyp der FoxO-*knock out*-Tiere hat jedoch nur unter optimalen Haltungsbedingungen Bestand. Bereits von Jünger *et al.* wurde postuliert, dass adulte FoxO-*knock out*-Tiere hypersensibel auf oxidativen Stress reagieren [109]. Diese These konnte im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Versuche verifiziert werden. Sowohl Imagos als auch Larven der FoxO-*knock out*-Linie (Foxo<sup>21</sup>), die einer potentiell



letalen Paraquatkonzentration ausgesetzt wurden, reagierten mit einer um 12 % (Imagos) bzw. 29 % (Larven) verkürzten Überlebensdauer verglichen mit Wildtyp-Tieren (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise scheint es sich bei der Stress-protectiven Funktion des FoxO-Transkriptionsfaktors um einen evolutionär konservierten Mechanismus zu handeln, wie Studien an Vertretern unterschiedlicher Gruppen zeigen: *Caenorhabditis elegans* [110], Maus [123] und Mensch [124],[125]. Die Beteiligung des FoxO-Proteins an der Reaktion auf oxidativen Stress wird in nachfolgenden Kapiteln eingehend diskutiert.

FoxO, ein als „*Survival*“-Gen [5] bezeichneter Faktor, der in Stresssituationen aktiviert wird und zellerhaltende Maßnahmen wie Detoxifikation, DNA-Reparatur oder Zellzyklus-arrest induziert [94], kann gleichermaßen letale Folgen auslösen. Als Transkriptionsfaktor mit einer hochvariablen Bandbreite an Funktionen handelt es sich bei FoxO um ein potentes und gleichzeitig sehr ambivalentes Protein. Einerseits gilt es als lebensverlängernd und tumorsuppressiv [104] und zugleich wird es als Onkogen eingestuft [Onkogenbank des BVL], eine Funktion die bei der Überexpression in larvalen Tracheen zum Vorschein gekommen ist. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Transkriptionsfaktor für die Entwicklung entbehrlich ist, aber unerlässlich für stressinduzierte physiologische und pathologische Prozesse.

## 5.2 FoxO - ein evolutionär konservierter Stressmediator

Während Arthropoden wie die Taufliege *Drosophila* aber auch Nematoden und weitere Tiergruppen mit einem ursprünglichen Bauplan [111] über einen einzigen Vertreter aus der O-Klasse der Forkhead Box-Proteine verfügen [110], hatten im Laufe der evolutionären Entwicklung der Chordata Genduplikationen dazu geführt, dass das Genom der Säuger vier funktionelle FoxO-Proteine kodiert [126]. Diese, entsprechend einer einheitlichen Nomenklatur als FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6 benannten Proteine [93], weisen nicht nur unterschiedliche Expressionsmuster auf, erste Studien weisen auch auf unterschiedliche physiologische Funktionen dieser vier Orthologe hin [126]. Eine Funktion des FoxO-Transkriptionsfaktors, die für alle Stämme postuliert wird, ist die eines Mediators einer zellulären Reaktion auf Stress [50],[111],[127],[128]. Meist einhergehend mit wechselnden Umweltbedingungen, bezeichnet der Begriff Stress in der Biologie einen belastenden Zustand für eine Zelle [57]. Folglich werden als zelluläre Stressantwort die durch Stress induzierten physiologischen Veränderungen zusammengefasst, die in der Zelle aktiviert werden, um entweder das Überleben der Zelle zu sichern oder sie zum Wohle des Gewebes bzw. des gesamten Organismus durch Apoptose zu opfern. Ursachen solcher physiologischer Veränderungen können sehr vielfältig sein und

umfassen Infektion, Verletzungen und die Bandbreite an exogenen Faktoren, denen jeder mit seiner Umwelt interagierende Organismus ausgesetzt ist.

### 5.2.1 FoxO - ein universeller Stressmediator im respiratorischen Epithel der *Drosophila*-Larve

Die Relevanz von FoxO für das Überleben von *Drosophila* unter oxidativen Stressbedingungen wurde in Kapitel 5.1.2 bereits vorgegriffen und war bereits der Inhalt zahlreicher Studien [100],[109],[110]. Nicht nur oxidativer Stress, sondern der Einfluss zahlreicher weiterer Stressoren wurde mit einer FoxO-Aktivierung in Verbindung gebracht. Allerdings führte die Wahl unterschiedlicher Modelle und die Heterogenität der Versuchsbedingungen zu einer Anhäufung fragmentarischer Informationen, die kein konsistentes Bild erscheinen lassen [51],[110],[111],[129]. Hier wurde erstmals der Versuch unternommen die Funktion des FoxO-Proteins als Stressmediator im respiratorischen Epithel der *Drosophila*-Larve zu charakterisieren und eine mögliche Differenzierung potentieller FoxO-Induktoren näher zu beleuchten. Dazu wurde eine Auswahl möglichst unterschiedlicher Stressfaktoren ausgewählt: 1) oxidativer Stress, der zumeist endogenen Ursprungs ist und primär aus einem Ungleichgewicht der Redox-Homöostase resultiert, 2) variierende Temperaturbedingungen, die oberhalb (40°C) und unterhalb (4°C) des physiologischen Bereichs der Taufliede liegen und möglichst natürliche Umweltbedingungen simulieren, 3) UV-Strahlung, ein potentes Mutagen, dem jedes terrestrische und tagaktive Individuum ausgesetzt ist und 4) Ernährungsstress, der hier in Form eines generellen Nährstoffentzuges (Hunger) Anwendung fand.

Epithelien, und nicht nur die der Fliege sondern diejenigen aller mehrzelligen Eukaryoten, verfügen über ausgesprochen potente Verteidigungsmechanismen (Kapitel 1.3). Neben immunologischen Prozessen, die eine Besiedlung mit pathogenen Mikroorganismen verhindern oder Invasoren attackieren [32],[39],[130], fungieren Epithelzellen auch als die erste Verteidigungslinie gegen Umweltstressoren [113]. Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin, die noch immer wenig verstandenen aber vielfach hochgradig krankheitsrelevanten Stressprozesse der respiratorischen Epithelzelle [64],[70],[71],[84] mit besonderem Fokus auf die Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO zu beleuchten. Dazu wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors unter Einfluss der o.g. Stressoren stellvertretend durch seine subzelluläre Lokalisierung analysiert (Abb. 4.3 - 4.7). Die Untersuchung larvaler Tracheen, die in ihren Epithelzellen ein FoxO-GFP-Fusionsprotein synthetisieren, ergab, dass unter Ausschluss jeglicher Stressoren das Fusionsprotein stets eine zytoplasmatische Lokalisierung aufweist. Dort ist es in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor inaktiv, die permanente Präsenz erlaubt jedoch eine schnelle

Aktivierbarkeit. Eine Stressexposition führte zu einer unmittelbar einsetzenden Verlagerung des GFP-Signals vom Zytoplasma zum Nukleus (Abb. 4.2). Trotz ihrer Heterogenität führten vier der Stressoren zu einer FoxO-Aktivierung innerhalb von 2 h. Hungerstress induzierte erst nach 6-12 h eine Translokation, was aber durch den Ernährungszustand der Larven zu Beginn der Hungerphase zu erklären ist. Erst nachdem die sich im Darm befindende Nahrung verdaut war, wurde der Nahrungsentzug physiologisch spürbar, was zu der verzögerten Induktion der Stressantwort führte. In Anbetracht dieser Ergebnisse konnte das FoxO-Protein als ein universell induzierbarer Stresseffektor identifiziert werden. Wie weiterführende Untersuchungen im larvalen Fettkörper andeuten (Daten nicht gezeigt), handelt es sich bei der Funktion von FoxO als universeller Stressmediator keineswegs um einen auf das Atemwegsepithel begrenzten Mechanismus, sondern einen generellen zellulären Stresssensor. Inzwischen konnten neben den genannten noch weitere FoxO-aktivierende Stressoren, wie Hypoxie (Daten nicht gezeigt) und bakterielle Infektion [131] detektiert werden, die die Hypothese untermauern.

Die Verschiedenartigkeit der angewandten Stressoren lässt vermuten, dass die FoxO-Aktivierung die Folge von Stimulationen unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden ist. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass FoxO die Expression unterschiedlicher Zielgene induziert, die ihrerseits in Abhängigkeit vom Stressor und Signalweg dirigiert wird. Eine nähere Analyse der Art der Translokationsinitialisierung könnte Hinweise auf den Signalweg bringen. Eine durch Dephosphorylierung induzierte FoxO-Translokation geht ausschließlich mit einer ILS-Inhibition einher, eine Phosphorylierung deutet auf eine Beteiligung von JNK oder MST1 hin [91] und in gleicher Weise könnte von einer posttranskriptionellen Modifikation durch Acetyl- oder Ubiquitin-Reste auf involvierte Regulatoren und Signaltransduktionskaskaden geschlossen werden.

### **5.2.2 Humane FoxOs - Stressmediatoren mit variierender Spezifität in respiratorischen Epithelzellen**

Nachdem die offenbar große Bedeutung des FoxO-Proteins als Stressmediator in den Tracheen der Taufliege aufgedeckt wurde, stellt sich die Frage nach der evolutionären Konservierung dieser Funktion. Zur Beantwortung dieser Frage wurde auf *in vitro*-Versuche unter Verwendung der humanen alveolären Epithelzelllinie A549 zurückgegriffen [70], die in Funktion und Physiologie trachealen Epithelzellen der *Drosophila*-Larve ähneln.

Dem alleinigen *Drosophila*-FoxO stehen in Säugetierzellen vier Orthologe, für die unterschiedliche Expressionsmuster postuliert werden [126], gegenüber. Eine

Quantifizierung der Expression der vier humanen *foxO*-Gene in A549-Zellen (Abb. 4.8) bestätigte dies und wies eine starke *foxO1a*-, *foxO3a*- und *foxO4*-Expression bei einer gleichzeitig nur marginalen *foxO6*-Expression nach. Das zuletzt entdeckte FoxO6 unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den drei anderen FoxO-Proteinen. Es weist nicht nur sequenzielle Unterschiede auf, die auf Selektionsprozesse zurückzuführen sind [126] sondern es zeigt auch eine disparate Expression, die sich vorwiegend auf einzelne Gehirnbereiche und das ZNS konzentriert, wo es an der zellulären Differenzierung beteiligt ist [96]. Aus diesen Gründen wurde von einer weiteren Analyse des FoxO6-Proteins im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

In Anlehnung an die Versuche zur Analyse der stressprovozierten FoxO-Translokation in *Drosophila* wurde in A549-Zellen die Synthese der FoxO1a-, FoxO3a- und FoxO4-Proteine mittels Immunfluoreszenz untersucht. Eine zytoplasmatische Lokalisierung im ungestressten Zustand der Zellen zeigt an, dass FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 als in ihrer Aktivität induzierbare Proteine im Zytoplasma vorliegen (Abb. 4.9 - 4.16). Diese Strategie ermöglicht bei Auftreten einer Stresssituation eine sofortige Aktivierung, Translokation und Expression von Zielgenen. Die Analyse einer stressinduzierten Aktivierung ergab für jedes der drei Proteine ein sehr individuelles Muster. In identischer Weise wie für das *Drosophila*-FoxO nachgewiesen, nimmt in humanen respiratorischen Epithelzellen FoxO1a die Funktion des universell induzierbaren Stresseffektors ein und reagiert hochsensibel auf eine Bandbreite unterschiedlicher Störungen, die auf die Zelle einwirken, mit einer sofortigen nukleären Translokation des Proteins (Abb. 4.9 und 4.10). Im Gegensatz zu FoxO1a zeigte FoxO3a keine Aktivierung durch Temperaturschwankungen (Abb. 4.11 und 4.12). Eine sowohl quantitative als auch qualitative Besonderheit der Translokation sowie die stärkste Spezifizierung wies das FoxO4-Protein auf (Abb. 4.13 - 4.16). Neben einem einzigartigen nukleären Akkumulationsmuster (Abb. 4.13) fand eine FoxO4-Translokation in einer variierenden Anzahl von Zellen einer stimulierten Population statt, stets in einer reproduzierbaren Abhängigkeit von der Art des Stressors. Dies deutet auf eine interzelluläre Kommunikation bzw. Interaktion hin, was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf. Das stärkste Aktivierungspotential wiesen dabei oxidativer Stress und UV-Strahlung auf (Abb. 4.16). Bei beiden handelt es sich um Stressoren mit einem besonders hohen Potential der Zell-, Protein- und DNA-Destruktion. Oxidativer Stress ist hier gleichbedeutend mit potentiell schädlicher ROS-Konzentration in der Zelle, welche die DNA-, Protein-, und Lipidschäden verursachen kann. UV-Strahlung kann als Mutagen entweder DNA direkt angreifen, oder aber als ROS-Generator fungieren und in einem begrenzten Masse selbst oxidativen Stress induzieren [132]. FoxO4 scheint auf Prozesse, die vor DNA-Schäden schützen oder Reparaturmechanismen aktivieren, spezialisiert zu sein.

Die Beobachtung, dass FoxO4 sich infolge einer Stress-Situation in kleinen Aggregaten innerhalb des Kerns sammelt, weist auf eine besonders hohe transkriptionelle Aktivität des Proteins hin. Denn die FoxO4-Aggregate kolokalisierten in perfekter Weise mit nicht-kondensierten euchromatischen, also besonders aktiven DNA-Arealen der Hoechst / DNA-Färbung (Abb. 4.13).

Bei den FoxO-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um strukturell und funktionell hochgradig konservierte Proteine. In *Drosophila* gibt es nur ein FoxO, das als genereller Mediator identifiziert wurde, welcher von einer Bandbreite variabler Stressoren aktiviert wird. Von den drei hier analysierten humanen Vertretern der FoxO-Familie wird die Funktion des universellen Stressmediators von FoxO1a eingenommen, während FoxO3a und FoxO4 in Sensitivität ihrer Aktivierung ab und zugleich in ihrer Spezifizierung zunehmen.

Offensichtlich ist mit wachsender Komplexität eines Organismus eine Spezifizierung der FoxO-Mediatoren von Vorteil. Sie erlaubt eine an die Art des Stressors abgestimmte Reaktion. Sowohl die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, als auch die nachgeschalteten Mechanismen, stellt insbesondere unter Stressbedingungen einen Ressourcenaufwand für die Zelle dar und bedarf stets einer Kosten-Nutzen-Abwägung. Stressfaktoren, die ein größeres Gefahrenpotential bergen, wie oxidativer Stress oder UV-Licht, aktivieren beispielsweise alle drei FoxO-Faktoren, die eine quantitativ und qualitativ höhere Transkription von Schutzproteinen gewährleisten und das Überleben der Zelle sichern.

### 5.3 Stress induziert eine AMP-Expression in *Drosophila*

Das Kennzeichen sowohl der humoralen als auch der systemischen Immunantwort von *Drosophila* ist die Synthese und Freisetzung Antimikrobieller Peptide (AMPs) als Reaktion auf eine Pathogeninvasion. Nicht nur Immunorgane wie der Fettkörper, sondern auch alle Epithelien und einige Hämocyten sind zur AMP-Synthese fähig [31-33]. Als Auslöser einer AMP-Freisetzung gilt die Interaktion von Oberflächenstrukturen eindringender Mikroorganismen mit spezifischen Rezeptoren, wodurch die Hauptimmunreaktionskaskaden der Taufliege aktiviert werden. Hierbei handelt es sich um den Toll- und IMD-Signalweg (Kapitel 1.3), die letztlich in der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Faktoren Dorsal, DIF und Relish resultieren. Die Transkriptionsfaktoren binden als Homo- oder Heterodimere an korrespondierende  $\kappa$ B-Sequenzen in den Promotorregionen der AMP-Gene [30]. Bei den 20 heute bekannten AMPs, die in sieben Gruppen zusammengefasst sind, handelt es sich um kleine kationische Peptide, die in ganz unterschiedlicher und noch nicht

vollständig verstandener Weise Invasoren, zu den Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze, Hefen, Viren und parasitische Protozoa zählen, attackieren [10],[13],[114]. Lange Zeit galt eine Infektion als der alleinige Aktivator einer AMP-Expression, die ausschließlich unter Beteiligung der NF- $\kappa$ B-Signalwege bzw. die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren induziert werden konnte. Beide Aussagen können anhand der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen widerlegt werden: 1) eine AMP-Expression kann unabhängig von einer Infektion durch Stress induziert werden (Abb. 4.17 - 4.20). Als AMP-stimulierende Stressoren wurde metabolischer Stress in Form von Hunger und oxidativer Stress identifiziert (Abb. 4.17 und 4.18) und 2) die stressinduzierte AMP-Expression wird nicht durch die transkriptionelle Aktivität der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Dorsal und Relish eingeleitet (Abb. 4.3 und 4.4 sowie Abb. 4.22 und 4.23). Vor diesem Hintergrund handelt es sich bei der stressinduzierten AMP-Expression um einen einzigartigen, von den klassischen AMP-Regulationskaskaden des angeborenen Immunsystems - Toll und IMD - unabhängigen Prozess, der sowohl in Epithelzellen (Abb. 4.17 B und 4.18 B), als auch im Fettkörper stattfindet (Abb. 4.17 A und 4.18 A). Zwar wurde eine stressinduzierte AMP-Expression nur im Epithel der Atemwege überprüft, die Vermutung liegt jedoch nahe, dass dies entsprechend einer Pathogen-induzierten AMP-Aktivierung für alle anderen Epithelien in gleicher Weise zutrifft. Die starke AMP-Expression, die im Gewebe kompletter Larven gemessen wurde, geht nachweislich auf die Aktivität des Fettkörpers zurück (Abb. 4.29 und nicht gezeigte Daten).

Erstaunlicherweise induziert Stress keine generelle AMP-Antwort, sondern die Expression einzelner oder einer kleinen Gruppe von AMPs. Hunger aktivierte sowohl im Epithel als auch im restlichen Gewebe ein gleichbleibendes AMP-Expressionsmuster, gekennzeichnet durch die induzierte Expression von *attacin* und *drosomycin*. Die Hunger-induzierte *attacin/drosomycin*-Expression wird im nächsten Kapitel näher diskutiert.

Im Fall von oxidativem Stress ergab sich zwischen Epithel und Gesamtgewebe kein einheitliches Expressionsmuster. Während oxidativer Stress im gesamten Larvengewebe ausschließlich die Expression von *drosomycin* aktivierte, wurde im Tracheenepithel zusätzlich die Expression von *cecropin*, *defensin* und *attacin* gemessen. Eine Klärung der Ursache für diese variierenden Expressionsmuster bedarf weiterer Analysen, dennoch deuten diese Ergebnisse auf eine Aktivierung individueller Signalwege durch Hunger und durch oxidativen Stress hin.

Die wichtigste Frage, die sich bei der Betrachtung dieser neuen Erkenntnisse stellt, ist die nach der Funktion Antimikrobieller Peptide in Abwesenheit gefährdender Krankheitserreger. Eine Möglichkeit der Interpretation dieser Befunde lautet Prävention. AMPs sind seit ihrer erstmaligen Entdeckung vor fast zwei Jahrzehnten [9] Ziel intensiver Forschung und zählen zu den am besten charakterisierten Molekülen des Immunsystems [13].



Trotzdem werden sie ausschließlich mit dem unspezifischen Abtöten von Mikroorganismen in Verbindung gebracht. Weitere Funktionen werden vermutet, konnten jedoch nie eindeutig nachgewiesen werden [132],[133].

Insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass *drosomycin* als einziges AMP-Gen in allen Geweben und durch alle Stressoren einschließlich der Hypoxie (Daten nicht gezeigt) in seiner Expression induziert wird, findet die Präventionshypothese Unterstützung durch frühe Studien von Uttenweiler-Joseph *et al.* Diese Studien charakterisierten Drosomycin als ein außerordentlich persistentes AMP, das selbst drei Wochen nach einer bakteriellen Expressionsinduktion in der Hämolymphe adulter *Drosophila* nachgewiesen werden konnte [135]. Zusammen mit seinem breiten Wirkspektrum prädestiniert diese Eigenschaft Drosomycin für die Aufgabe einer unspezifischen Infektionsprotektion.

Die Frage, warum die anderen untersuchten Stressoren keine AMP-Expression induzierten, muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben. Bestärkt durch Hypoxie-Untersuchungen (Daten nicht gezeigt), die ebenfalls eine stressinduzierte AMP-Expression aufdeckten, soll hier dennoch ein Erklärungsversuch unternommen werden. Diese Vermutung nimmt Bezug auf das ROS-generierende Potential der in dieser Arbeit verwendeten Stressoren. Es ist bekannt, dass Paraquat direkt die Bildung von ROS induziert. Hunger führt ebenfalls zur Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen, was auf die ROS-regulierende Funktion von Insulin zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei erwähnt, dass das Ausbleiben der Insulin-Freisetzung in einer Hungerphase in einer ROS-Anreicherung in der Zelle resultiert [78],[84].

In einer Studie von Tang *et al.* konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass Melanisierung, die Aufgrund der Blockade des Inhibitors Spn77Ba in Tracheen induziert wurde, gleichzeitig zu einer systemischen Expression von *drosomycin* durch den Toll-Signalweg führt [18]. Bei der hier gezeigten stressinduzierten AMP-Expression kann eine Beteiligung des Toll-Signalweges oder zumindest des Toll-abhängigen NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors Dorsal ausgeschlossen werden, da zu keinem Zeitpunkt eine Dorsal-Translokation detektiert wurde (Abb. 4.3 und 4.4). Dennoch deutet die Tatsache, dass eine lokal induzierte Melanisierung zu einer systemischen AMP-Antwort führt, auf die Freisetzung eines Botenstoffes. Bei der Melanisierung wurde die Bildung von ROS vielfach beschrieben [16],[17]. Dabei dienen die reaktiven Sauerstoffverbindungen zwar in erster Linie der direkten Tötung von Mikroorganismen, es spricht jedoch viel dafür, dass ROS auch bei der Melanisierung die Funktion eines Botenstoffes erfüllt [136],[137].

Da eine Melanisierung oft die erste Verteidigungsreaktion gegen insbesondere lokal invadierende Pathogene darstellt, ist die systemische Aktivierung von AMPs ein sinnvolles Manöver, das einer Ausbreitung und Besiedlung durch das Pathogen präventiv



entgegenwirkt [138]. Unabhängig vom Ursprung der stressinduzierten AMP-Expression gilt es als sicher, dass dieser Mechanismus Vorteile für das Überleben des Organismus bringt [133], sei es durch eine Infektions-Prävention in Stresssituationen oder durch noch unbekannte Funktionen Antimikrobieller Peptide.

#### 5.4 FoxO - ein Bindeglied zwischen Metabolismus und Immunantwort

Eine eingehende Analyse der Hunger-induzierten *attacin*- und *drosomycin*-Expression identifizierte den Transkriptionsfaktor FoxO als direkten Induktor sowohl der *attacin*- als auch der *drosomycin*-Expression und lieferte Hinweise auf eine Beteiligung des Insulin/IGF-Signalweges an der durch Hunger hervorgerufenen FoxO-Aktivierung und AMP-Antwort.

Aufgrund einer Relish-GFP-Translokation im Tracheenepithel hungernder *Drosophila*-Larven (Abb. 4.3) wurde zunächst die Möglichkeit einer konventionellen AMP-Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor Relish näher betrachtet. Der Einsatz Relish-defizienter Larven (Relish<sup>E38</sup>) offenbarte, dass der NF-κB-Faktor Relish nicht essentiell für die Expression von *attacin* und *drosomycin* infolge von Hungerstress ist (Abb. 4.22 und 4.23). Aufgrund dessen und in Anbetracht einer fehlenden Dorsal-GFP-Translokation (Abb. 4.3), kann gefolgert werden, dass eine Hunger-induzierte AMP-Expression ein von den Pathogen-empfindlichen Toll- und IMD-Signalwegen des angeborenen Immunsystems unabhängiger Mechanismus ist.

Anhaltspunkte, die auf eine Interaktion zwischen FoxO und AMP-Expression hinweisen, ergaben nicht nur die Hunger-induzierte nukleäre Translokation des FoxO-GFP-Fusionsproteins in larvalen Tracheen (Abb. 4.3) sondern voneinander unabhängige publizierte Beschreibungen einer AMP-Expression, insbesondere einer *attacin*/*drosomycin*-Kombination, infolge einer konstitutiven Aktivierung von FoxO in *Drosophila*-Larven und Imagos [102],[131]. Aufgrund der letalen Folgen einer entsprechenden FoxO<sup>TM</sup>-Aktivierung in den Tracheen sowie im gesamten Tier war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich dies zu überprüfen.

Der Einsatz FoxO-defizienter Larven (FoxO<sup>21</sup>), die nach einer zwölfstündigen Hungerphase keine Veränderung in ihrem AMP-Expressionsniveau aufwiesen, zeigte das FoxO-Protein schließlich als direkten Induktor der Hunger-abhängigen *attacin*- und *drosomycin*-Expression (Abb. 4.24 und 4.25). Der Nachweis konservierter FoxO-Bindedomänen (TTGTTTAC) im *drosomycin*-Promotor und Forkhead-Bindemotive (TXXTTAY) in

Promotorregionen aller AMP-Gene mit Ausnahme von *drosocin* bestärkt die Möglichkeit einer direkten Steuerung der AMP-Expression durch FoxO [102]. Inzwischen konnte eine Aktivität dieser regulatorischen Regionen bei einer FoxO-Überexpression betätigt werden [102] und lässt keinen Zweifel am Potential von FoxO für die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene.

Die in dieser Arbeit angewendete Form des Ernährungsstresses, der vollständige Entzug von Nährstoffen, zieht Veränderung des Energiestatus der Zelle nach sich und beeinflusst unmittelbar die Insulin-Freisetzung [78],[81],[82]. Das mit dem Insulin-Rezeptor (InR) in Wechselwirkung tretende Insulin aktiviert den ILS, der ein gut untersuchter negativer Regulator des FoxO-Transkriptionsfaktors ist [82],[94],[109] (Kapitel 1.4.3).

*Drosophila* bietet die einzigartige Option den Insulin/IGF-Signalweg selektiv und effektiv durch den Einsatz des Inhibitors SecinH3 zu blockieren [87]. SecinH3 ist ein kleines Molekül und fungiert als Zytoshesin-Antagonist. *Drosophila* verfügt über ein einziges Zytoshesin, nämlich das Homolog des humanen Zytoshesin 3 (Steppke). Steppke agiert stromaufwärts der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und ist essentiell für die Regulierung der Kinase Akt und somit indirekt für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO verantwortlich [86]. Die Behandlung mit SecinH3 inhibiert die Aktivität der Kinase Akt und nachgewiesenermaßen auch die Phosphorylierung von FoxO [87]. Diese künstlich herbeigeführte konstitutive nukleäre FoxO-Lokalisation phänotypisierte die Hunger-induzierte Expression von *attacin* und *drosomycin* (Abb. 4.26). Die Kombination dieser Ergebnisse untermauert die Hypothese, dass Hunger den Transkriptionsfaktor FoxO durch das Aufheben der ILS-Inhibition aktiviert und die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene induziert (Abb. 5.1). Ein ultimativer Beweis für die Verbindung zwischen FoxO und der beobachteten AMP-Expression infolge der ILS-Inhibition muss aber noch erbracht werden.

Die hier aufgedeckten Zusammenhänge stehen in Übereinstimmung mit neuesten Studienergebnissen von Becker *et al.*, die in *Drosophila*-Imagos aber auch in humanen Zelllinien durchgeführt wurden [102]. Dabei wurde eine Regulierung der Expression humaner AMPs (DEFB) infolge einer SecinH3-induzierten ILS-Deaktivierung detektiert [102]. In Korrelation mit der in dieser Arbeit erbrachten Beobachtung einer FoxO1a- und FoxO3a-Translokation in einer humanen Lungenepithelzelllinie (Abb. 4.9 und 4.11) infolge einer Hungersimulation, kann eine evolutionäre Konservierung einer FoxO-regulierten AMP-Expression in Insekten und Säugern angenommen werden.

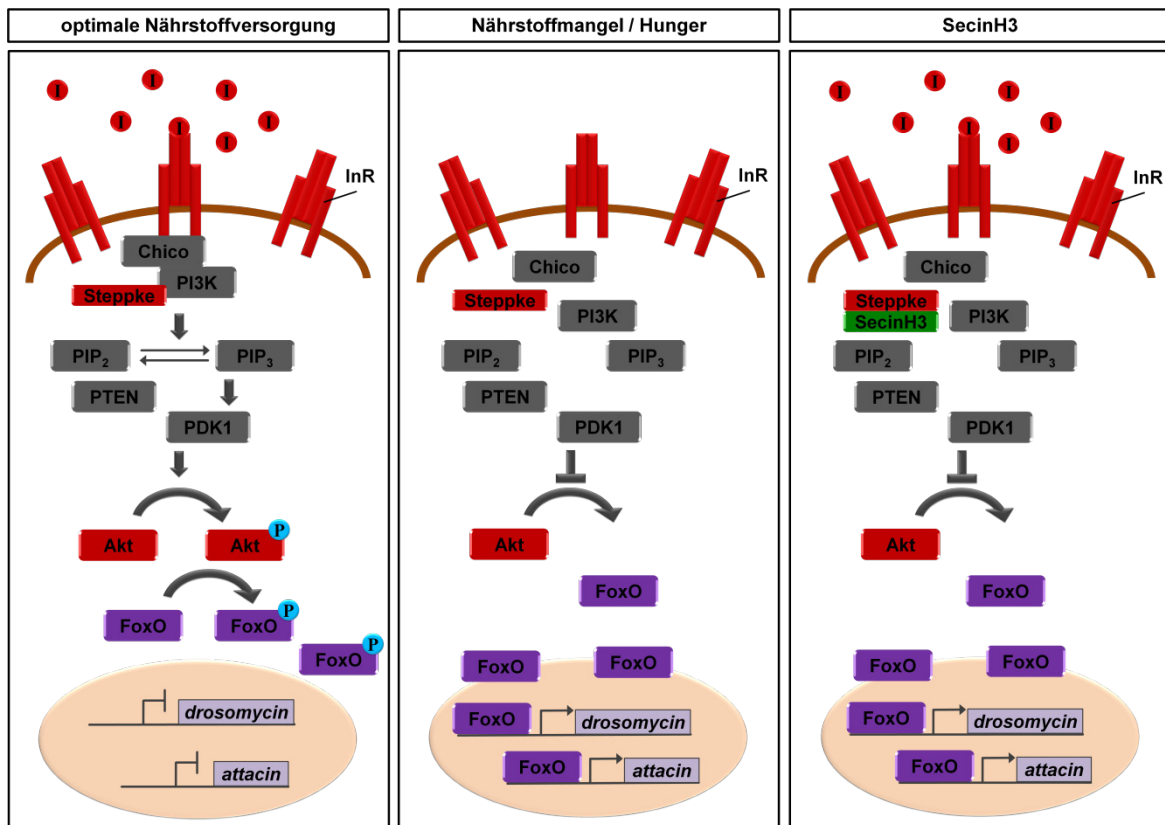


Abb. 5.1: Hypothese der FoxO-Aktivierung und AMP-Expression in Abhängigkeit der Insulin/IGF-Signalkaskade bei Nährstoffpräsenz, Nährstoffmangel und unter Einfluss von SecinH3

Die Identifikation eines bisher unbekannten NF- $\kappa$ B-Signalweg-unabhängigen AMP-Regulators, eröffnet völlig neue Perspektiven der Immunregulation und präsentiert mit FoxO ein Bindeglied zwischen zellulärem Stress und Abläufen des Immunsystems. Dies ermöglicht eine Synchronisation der Immunabwehr in Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen.

## 5.5 Oxidativer Stress induziert AMP-Expression in einem FoxO-unabhängigen Prozess

Die durch oxidativen Stress induzierte Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in *Drosophila*, insbesondere die des *drosomycin* war bereits Inhalt der in Kapitel 5.2 geführten Diskussion. Hier sollen nun Mechanismen, die durch oxidativen Stress beeinflusst werden, charakterisiert und die Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO darin eingehender erläutert werden.

Der Zustand, der im Verlauf dieser Arbeit als oxidativer Stress bezeichnet wird, wurde exogen unter Verwendung einer Chemikalie induziert: Paraquat oder 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid. Neben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) ist der Einsatz von Paraquat eine langjährig etablierte Methode der *in vivo* und *in vitro* ROS-Generierung [61]. Unter

aeroben Bedingungen reduziert Paraquat  $O_2$  unmittelbar zu  $O_2^{\bullet -}$  (Hyperoxid-Anion), eine hochreaktive Sauerstoffspezies. Im biologischen System findet diese Reaktion in gleicher Weise, jedoch unter gleichzeitiger NADPH-Oxidation statt [61].

Entgegen der Beschreibung Paraquat-induzierter Mechanismen von Suntres [140], konnte unter den in dieser Arbeit herrschenden Stressbedingungen jedoch keine ansteigende Expression der Superoxiddismutase-Gene (*SOD* und *MnSOD*) detektiert werden. Superoxiddismutasen katalysieren in einem ersten Detoxifikationsschritt die Reaktion der Hyperoxid-Anionen zu  $H_2O_2$ , das im zweiten Detoxifizierungsschritt unter der katalytischen Wirkung der Catalase zu  $O_2$  und  $H_2O$  reagiert.

Das Ausbleiben eines *SOD*- und *MnSOD*-Expressionsanstiegs spricht nicht für ihre Inaktivität. Da es sich um konstitutiv aktive Enzyme handelt, ist anzunehmen, dass sie in einer ausreichenden zellulären Konzentration vorliegen, um einem plötzlich auftretenden ROS-Ungleichgewicht, wie das hier durch Paraquat induzierte, entgegenzuwirken.

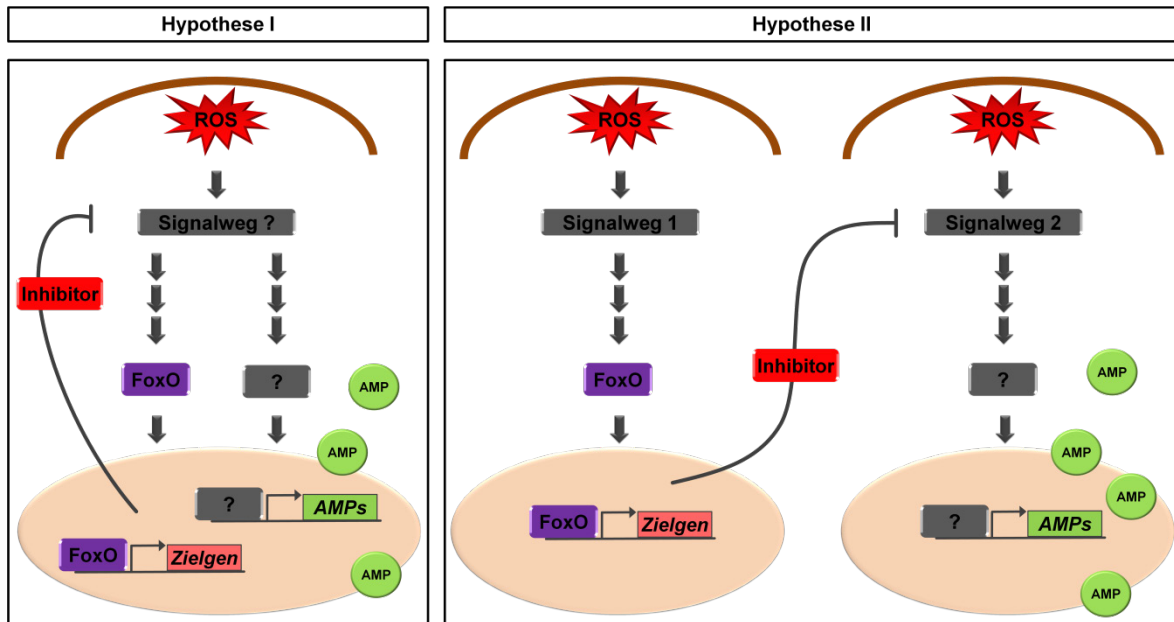
Die *gadd45*-Expression wurde ebenfalls als *read-out* für ROS-induzierte Mechanismen verwendet. Gene der *gadd45*-Familie kodieren für kleine evolutionär hochgradig konservierte Proteine, die wie ihre Bezeichnung (*growth arrest DNA damage*) vermuten lässt, am Zellzyklusarrest und an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Studien letzter Jahre konnten die GADD45-Proteine als Stresssensoren charakterisieren, die durch physiologischen oder Umweltstress aktiviert werden und selbst Prozesse der zellulären Stressantwort modulieren [47].

In gleicher Weise wie die in Kapitel 5.4 diskutierte Analyse der Hunger-induzierten FoxO/AMP-Aktivierung, wird nun die durch oxidativen Stress induzierte FoxO-Aktivierung (Abb. 4.4) und AMP-Expression (Abb. 4.18) näher beleuchtet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bisher völlig unbekannte Beziehung zwischen oxidativem Stress und der Induktion einer AMP-Expression identifiziert werden. Diese Induktion unterliegt, trotz einer gleichzeitigen FoxO-Translokation, nicht der Regulation durch FoxO (Abb. 4.27 und 4.28). Hunger und oxidativer Stress lösen zwei antagonistische Funktionen des Transkriptionsfaktors FoxO in Bezug auf die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene aus, was für zwei unabhängige Signaltransduktionsmechanismen spricht. Bezugnehmend auf das Defizit von FoxO-*knock out*-Larven (FoxO<sup>21</sup>) infolge von Hunger die Expression von AMP-Genen zu induzieren, wurde FoxO als direkter Induktor dieses Prozesses detektiert (Abb. 4.24 und 4.25). Im Gegensatz dazu reagieren FoxO-*knock out*-Larven auf oxidativen Stress mit einer um ein Vielfaches gesteigerten Expression aller sieben AMPs (Abb. 4.27 und 4.28). Die limitierte Regulierung einer konstanten Gruppe von AMPs bei Paraquat-Exposition in Wildtyp-Tieren (*drosomycin* im kompletten Larvengewebe; *cecropin*, *defensin*, *attacin* und

*drosomycin* im larvalen Tracheenepithel), war in FoxO-*knock out*-Larven vollständig aufgehoben (Abb. 4. 18, Abb. 4.27 und 4.28).

Die Betrachtung und Kombination dieser Ergebnisse brachte letztlich zwei hypothetische Mechanismen zutage (Abb. 5.2), die der Suche nach einem potentiellen Signaltransduktionsweg eine Richtung geben sollen.



**Abb. 5.2:** Hypothesen zur Erklärung einer durch oxidativen Stress induzierten AMP-Regulation durch den Transkriptionsfaktor FoxO

Die erste Hypothese (Abb. 5.2 Hypothese I) nimmt die ROS-bedingte Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade an. Diese induziert in einem analogen Prozess die Aktivierung von FoxO und eines weiteren Transkriptionsfaktors. Dieser unbekannte Transkriptionsfaktor interagiert mit AMP-Genen und induziert ihre Expression. Aus der Liste der potentiellen Kandidaten kann nicht nur FoxO selbst sondern auch die NF- $\kappa$ B-Faktoren Relish und Dorsal ausgeschlossen werden (Abb. 4.4). Parallel dazu induziert FoxO die Expression eines putativen Zielgens, das einen Inhibitor des eigenen Signalweges kodiert und in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die eigene Expression aber auch die der AMP-Gene bremst.

Die zweite Hypothese nimmt in gleicher Weise die ROS-induzierte Aktivierung zweier Transkriptionsfaktoren an, jedoch unter Einbeziehung zweier unabhängiger Signaltransduktionskaskaden (Abb. 5.2 Hypothese II). Signalweg 1 aktiviert eine FoxO-Translokation und induziert die Transkription eines Inhibitors, der in einem autokrinen Prozess Signalweg 2 in seiner Aktivität inhibiert und die AMP-Expression reduziert.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich um einen der hypothetischen Prozesse zu verifizieren oder aber beide zu widerlegen. Dennoch erscheint Hypothese II realistischer, denn die Messung der *drosomycin*-Expression über einen Zeitraum von 6 h im Gewebe

von Larven, die konstant oxidativem Stress ausgesetzt waren, zeigte eine proportional zur Expositionsdauer wachsende *drosomycin*-Expression (Abb. 4.30 A). Eine Beobachtung die durch eine inhibitorische Autoregulation eines einzigen Signalweges (Abb. 5.2 Hypothese I) nur schwer in Einklang zu bringen wäre, mit der Aktivierung zweier unabhängiger Signalkaskaden jedoch durchaus vereinbar ist (Abb. 5.2 Hypothese II).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Signalwege eindeutig als potentielle Kandidaten identifiziert werden, da sie eine Aktivierung durch oxidativen Stress erfahren. Dabei handelt es sich um den JNK-, Jak/STAT- und der Keap1-Nrf2-Signalweg (Abb 4.31 - 4.35).

Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch oxidativen Stress wurde indirekt durch die Promotoraktivität eines JNK/Basket-Zielgenes (*puckered*) im Mitteldarm der Larve im *lacZ*-Reportersystem nachgewiesen. Oxidativer Stress wurde in dieser Arbeit durch Beimischung von Paraquat in die Nahrung der Larven appliziert, folglich wurde das Paraquat mit der Nahrung primär in den Gastrointestinaltrakt des Tieres, sowie in einem geringen Masse durch die Kutikula, aufgenommen. Obwohl die Epidermis aber insbesondere das gastrointestinale Epithel nachweislich über eine funktionelle JNK-Transduktionskaskade verfügen (Kapitel 1.3.2), war eine nur sehr schwache und lokal begrenzte JNK/Basket-Aktivität im mittleren Darmbereich nachweisbar (Abb. 4.31). Aufgrund einer höheren Sensibilität wurde die JNK/Basket-Aktivität anschließend, stellvertretend durch die Quantifizierung der Zielgenexpression (*puckered* und *ATG18.2*), im Fettkörper und im Tracheengewebe untersucht (Abb. 4.32 und 4.33). Zusammenfassend zeigte sich, dass der JNK-Signalweg sowohl in Epithelien des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes, als auch im Hauptimmunorgan der Taufliede durch oxidativen Stress aktiviert wird. Diese Feststellung steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen, die sich diesem Thema bereits zuvor gewidmet haben [41],[42],[46],[141]. ROS bewirken offenbar eine mechanische Dissoziation des Komplexes, eine Autophosphorylierung von Ask1 und letztlich eine Konformationsänderung des Komplexes zu einem sogenannten aktivierten Signalosom, welches das nächste Glied in der Transduktionskette JNKK/Hemipterous durch Phosphorylierung aktiviert [46]. Eine wichtige Funktion des JNK-Weges unter oxidativen Stressbedingungen ist die Einleitung der Apoptose durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1 [142]. Darüber hinaus ist die terminale Kinase des JNK-Signalweges JNK/Basket bekannt für ihr Potential, das zytoplasmatische FoxO durch Monophosphorylierung des Threonin (Abb. 1.9) zu aktivieren [91]. Diese Funktion ist ein weiteres Indiz, das den JNK-Signalweg zu einem potentiellen Vermittler zwischen ROS-Stress und AMP-Antwort macht. Trotz des Einsatzes transgener JNK/Basket-defizienter



*Drosophila*-Larven als auch einer künstlich herbeigeführten Signalweg-Blockade durch den JNK-Inhibitor SP600125 konnte mit diesen Mitteln der JNK-Weg nicht als AMP-Induktor verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Als zweiter potentieller Kandidat für eine ROS-induzierte Signaltransduktion wurde der Jak/STAT-Signalweg identifiziert. Primär ist der Jak/STAT-Weg für seine wichtige Rolle bei der Proliferation, Protektion gegen Gewebeschäden und Proteindegradierung insbesondere für die Reaktion auf Gewebeverletzungen bekannt [53],[56]. In humanen Zellen konnte eine Verbindung zwischen ROS und der Aktivierung des STAT92E-Transkriptionsfaktors bereits nachgewiesen werden [143]. Insbesondere im Zusammenhang mit einer septischen Verletzung wurde eine ROS-beeinflusste Aktivierung des Jak/STAT-Weges auch in *Drosophila* beobachtet [144]. Dennoch ist über eine unmittelbare Funktion des Jak/STAT-Signalwegs bei der oxidativen Stressantwort wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit ist es jedoch gelungen, den Jak/STAT-Weg als einen wichtigen Signalweg der Zelle bei der Reaktion auf oxidativen Stress zu identifizieren (Abb. 4.34). Diese Aktivierung erfolgt jedoch selektiv und ist auf wenige Organe beschränkt. Visualisiert durch eine GFP-gekoppelte Promotoraktivität des STAT92E-Zielgens *socs36E*, wurde eine ROS-induzierte Jak/STAT-Aktivität im Darm, in der quergestreiften subepidermalen Muskulatur der Larven und in Tracheen detektiert (Abb. 4.34). Die starke Signalweg-Aktivierung in der Muskulatur korreliert mit Beobachtungen von Liu *et al.*, die zeigen, dass der Jak/STAT-Weg unentbehrlich für die somatische Muskelentwicklung in *Drosophila* ist [115]. Zwar bleibt die Verbindung zwischen ROS und Muskel-spezifischer Jak/STAT-Aktivität weiterhin unklar, Hinweise auf eine Abhängigkeit konnten jedoch in vaskulären glatten Muskelzellen gefunden werden. In diesen induzierte eine ROS-Exposition die Aktivierung von Heatshock-Proteinen via Jak/STAT [145]. In Muskelzellen, die durch ihren besonders hohen Sauerstoffbedarf sehr sensitiv auf Schwankungen der Sauerstoff-Redox-Balance reagieren, erhöht der Jak/STAT-Weg offensichtlich die Adaption an oxidative Stressbedingungen.

Im Hinblick auf die Zuordnung dieser Funktion zum Jak/STAT-Weg fällt auf, dass die Organe der Jak/STAT-Signalweg-Aktivierung (Abb. 4.34) nicht mit den Regionen einer ROS-induzierten *drosomycin*-Expression (Abb. 4.29) übereinstimmen. Besonders auffällig war diese Diskrepanz im Fettkörper, dem Organ, das die stärkste AMP-Antwort auf oxidativen Stress zeigte und gleichzeitig keine Jak/STAT-Aktivierung aufwies. Aufgrund dieser Tatsache erscheint eine Jak/STAT-induzierte *drosomycin*-Expression als unwahrscheinlich.

Als dritter potentieller Transduktor einer ROS-induzierten AMP-Antwort wurde der Keap1-Nrf2-Signalweg identifiziert (Abb. 4.35), ein Signalweg, dessen primäre Funktion die zelluläre Stressantwort ist (Kapitel 1.4.2). Insbesondere durch oxidativen Stress aktiviert,



induziert der Keap1-Nrf2-Signalweg eine Reihe von Rettungsmechanismen und die Transkription zellprotektiver Faktoren [67],[74],[75]. Der Mensch verfügt über 32 gut beschriebene Nrf2-Zielgene [76],[77]. Auch in *Drosophila* erfüllt der Keap1-Nrf2-Signalweg antioxidative und detoxifizierende Aufgaben [66], was mit der in dieser Arbeit präsentierten Aktivierung des Signalweges unter oxidativen Stressbedingungen übereinstimmt. In neueren Studien aufgedeckte Wechselbeziehungen zwischen dem Transkriptionsfaktor Nrf2 und der Insulin-Signalkaskade [78] sowie dem Transkriptionsfaktor FoxO [79] bestärken die These, dass der Keap1-Nrf2-Signalweg an der ROS-provozierten Regulierung der AMP-Gen-Transkription beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei Reaktionskaskaden (JNK-, Jak/STAT- und Keap1-Nrf2-Signalweg) als Vermittler einer oxidativen Stressantwort vorgeschlagen. Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt weder die Frage nach dem Signalweg, der eine ROS-induzierte FoxO-Aktivierung vermittelt, noch nach der ROS-induzierten AMP-Regulation, beantwortet werden. Hinzu kommt eine Reihe weiterer Komponenten und potentieller Kreuzreaktionen, deren Mitwirkung möglich ist und intensiverer Analysen bedarf.

Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass der Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg eine entscheidende Rolle in der durch oxidativen Stress hervorgerufenen AMP-Expression einnimmt. Zum einen stellt oxidativer Stress einen der wichtigsten Regulatoren des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweges dar [63],[146],[147] und zum anderen ist das Wnt-Effektormolekül  $\beta$ -Catenin ein hinreichend charakterisierter Coaktivator der transkriptionellen Aktivität von FoxO [147]. Auch die Kooperation zwischen  $\beta$ -Catenin, FoxO und oxidativem Stress war bereits Gegenstand der Forschung und gilt als erwiesen [63],[64]. Dennoch erbrachten in dieser Arbeit durchgeführte Versuche keinen Beweis für eine Beteiligung des Wnt- $\beta$ -Catenin-Weges an der ROS-induzierten AMP-Expression. Zur Analyse der Wnt-Aktivierung kam ein standardisiertes *read-out* zum Einsatz, das sich der Expression der *axin*- und  *$\beta$ -catenin*-Gene bedient. Axin ist ein autoregulatorischer Inhibitor und gleichzeitig Zielgen der Wnt-Kaskade und  $\beta$ -Catenin ist ein Signalmolekül des Wnt-Weges, das im Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor interagiert. Die hier verwendeten oxidativen Stressbedingungen führten weder zur induzierten Expression von *axin* noch von  *$\beta$ -catenin*. Des Weiteren wurde in Wnt-defizienten Larven eine vergleichbare AMP-Expressionszunahme detektiert, wie in Wildtyp-Tieren (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann in Anbetracht dieser Ergebnisse eine Beteiligung des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweges an einer durch oxidativen Stress hervorgerufenen AMP-Regulierung als unwahrscheinlich bezeichnet werden.

Vielfach wurde publiziert, dass oxidativer Stress FoxO auf unterschiedlichste Weise aktivieren kann. An einem dieser Mechanismen ist beispielsweise SIRT1 (Sirtuin) beteiligt, das mit FoxO assoziiert und so zu seiner Deacetylierung führt [91]. Die Folge ist eine Expressionszunahme von Zielgenen, die am Zellzyklusarrest oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind unter anderem auch GADD45 [148]. Wie zuvor bereits erwähnt, konnte auch in *Drosophila*-Larven, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, eine Erhöhung der *gadd45*-Expression detektiert werden (Abb. 4.30 E). Diese Beobachtung macht das SIRT1 zu einem interessanten Kandidaten für weitere Analysen.

Abschließend kann an dieser Stelle zusammengefasst werden, dass oxidativer Stress die Translokation des Transkriptionsfaktors FoxO und zugleich die Expression Antimikrobieller Peptid-Gene in der Taufliege *Drosophila* induziert. Dies stellt eine bislang nicht bekannte Verbindung zwischen oxidativem Stress und einer Immunantwort dar, die jedoch völlig unabhängig von bekannten Reaktionskaskaden des angeborenen Immunsystems abläuft. In diesem Zusammenhang konnte FoxO als ein inhibitorischer Regulator der AMP-Expression identifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass ROS nicht nur omnipräsenter Bestandteil der zellulären Physiologie sind, sondern eine Vielzahl von Funktionen induzieren, ist eine Aufklärung der Verhältnisse zwischen ROS, FoxO-Aktivierung und AMP-Expression zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

## 6 Literatur

- [1] A. H. Brand and N. Perrimon, "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.," *Development*, vol. 118, no. 2, pp. 401–15, Jun. 1993.
- [2] S. E. McGuire, P. T. Le, A. J. Osborn, K. Matsumoto, and R. L. Davis, "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*," *Science*, vol. 302, no. 5651, pp. 1765–8, Dec. 2003.
- [3] M. L. Suster, L. Seugnet, M. Bate, and M. B. Sokolowski, "Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap.," *Genesis*, vol. 39, no. 4, pp. 240–5, Aug. 2004.
- [4] V. Pilauri, M. Bewley, C. Diep, and J. Hopper, "Gal80 dimerization and the yeast GAL gene switch.," *Genetics*, vol. 169, no. 4, pp. 1903–14, Apr. 2005.
- [5] C. Wagner, "Die Taefliege *Drosophila melanogaster* als Modell für die Analyse entzündlicher Erkrankungen der Atemwege," 2008.
- [6] C. Wagner, K. Isermann, and T. Roeder, "Infection induces a survival program and local remodeling in the airway epithelium of the fly.," *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 23, no. 7, pp. 2045–54, Jul. 2009.
- [7] D. A. Kimbrell and B. Beutler, "The evolution and genetics of innate immunity.," *Nature reviews. Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 256–67, Apr. 2001.
- [8] J. A. Hoffmann, "The immune response of *Drosophila*," *Nature*, vol. 426, no. 6962, pp. 33–8, Nov. 2003.
- [9] B. Lemaitre, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann, "*Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 26, pp. 14614–9, Dec. 1997.
- [10] P. Bulet and R. Stöcklin, "Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation.," *Protein and peptide letters*, vol. 12, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2005.
- [11] J.-L. Imler and P. Bulet, "Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation.," *Chemical immunology and allergy*, vol. 86, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2005.
- [12] C. Hetru and J. A. Hoffmann, "NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 6, p. a000232, Dec. 2009.
- [13] B. Lemaitre and J. Hoffmann, "The host defense of *Drosophila melanogaster*," *Annual review of immunology*, vol. 25, pp. 697–743, Jan. 2007.
- [14] S. Govind, "Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways.," *Insect science*, vol. 15, no. 1, pp. 29–43, Feb. 2008.

- [15] L. Cerenius and K. Söderhäll, "The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.," *Immunological reviews*, vol. 198, pp. 116–26, Apr. 2004.
- [16] L. Cerenius, B. L. Lee, and K. Söderhäll, "The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity.," *Trends in immunology*, vol. 29, no. 6, pp. 263–71, Jun. 2008.
- [17] H. Tang, "Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*.," *Fly*, vol. 3, no. 1, pp. 105–11, 2009.
- [18] H. Tang, Z. Kambris, B. Lemaitre, and C. Hashimoto, "A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*.," *Developmental cell*, vol. 15, no. 4, pp. 617–26, Oct. 2008.
- [19] B. Lemaitre, "Focus on TLR signaling: The road to Toll," *Immunology*, pp. 1–7, 1993.
- [20] X. Hu, Y. Yagi, T. Tanji, S. Zhou, and Y. T. Ip, "Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 25, pp. 9369–74, Jun. 2004.
- [21] I.-H. Jang, N. Chosa, S.-H. Kim, H.-J. Nam, B. Lemaitre, "A Spätzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity.," *Developmental cell*, vol. 10, no. 1, pp. 45–55, Jan. 2006.
- [22] T. Tanji, X. Hu, A. N. R. Weber, and Y. T. Ip, "Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*.," *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 12, pp. 4578–88, Jun. 2007.
- [23] N. Basbous, F. Coste, P. Leone, R. Vincentelli, J. Royet, C. Kellenberger, and A. Roussel, "The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway.," *EMBO reports*, vol. 12, no. 4, pp. 327–333, Mar. 2011.
- [24] K.-M. Choe, H. Lee, and K. V. Anderson, "*Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 4, pp. 1122–6, Jan. 2005.
- [25] T. Kaneko, T. Yano, K. Aggarwal, J.-H. Lim, K. Ueda, Y. Oshima, C. Peach, D. Erturk-Hasdemir, W. E. Goldman, B.-H. Oh, S. Kurata, and N. Silverman, "PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan.," *Nature immunology*, vol. 7, no. 7, pp. 715–23, Jul. 2006.
- [26] S. Kurata, "Extracellular and intracellular pathogen recognition by *Drosophila* PGRP-LE and PGRP-LC.," *International immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 143–8, Mar. 2010.
- [27] A. Takehana, T. Katsuyama, T. Yano, Y. Oshima, H. Takada, T. Aigaki, and S. Kurata, "Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 21, pp. 13705–10, Oct. 2002.

- [28] B. Lemaitre, E. Kromer-Metzger, L. Michaut, E. Nicolas, M. Meister, P. Georgel, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann, "A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 21, pp. 9465–9, Oct. 1995.
- [29] R. S. Khush, F. Leulier, and B. Lemaitre, "Drosophila immunity: two paths to NF-kappaB.," *Trends in immunology*, vol. 22, no. 5, pp. 260–4, May 2001.
- [30] M. S. Busse, C. P. Arnold, P. Towb, J. Katrivesis, and S. A. Wasserman, "A kappaB sequence code for pathway-specific innate immune responses.," *The EMBO journal*, vol. 26, no. 16, pp. 3826–35, Aug. 2007.
- [31] P. Tzou, S. Ohresser, D. Ferrandon, M. Capovilla, J. M. Reichhart, B. Lemaitre, J. A. Hoffmann, and J.-L. Imler, "Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia.," *Immunity*, vol. 13, no. 5, pp. 737–48, Nov. 2000.
- [32] C. Wagner, K. Isermann, H. Fehrenbach, and T. Roeder, "Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune system.," *BMC genomics*, vol. 9, p. 446, Jan. 2008.
- [33] I. Akhouayri, C. Turc, J. Royet, and B. Charroux, "Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the *Drosophila* respiratory epithelium.," *PLoS pathogens*, vol. 7, no. 10, p. e1002319, Oct. 2011.
- [34] N. Silverman, R. Zhou, R. L. Erlich, M. Hunter, E. Bernstein, D. Schneider, and T. Maniatis, "Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 49, pp. 48928–34, Dec. 2003.
- [35] J. M. Park, H. Brady, M. G. Ruocco, H. Sun, D. Williams, S. J. Lee, T. Kato, N. Richards, K. Chan, F. Mercurio, M. Karin, and S. a Wasserman, "Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*.," *Genes & development*, vol. 18, no. 5, pp. 584–94, Mar. 2004.
- [36] S. Guntermann and E. Foley, "Dredd is an essential component of the c-Jun N-terminal kinase pathway in the *Drosophila* IMD-dependent immune response.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 35, pp. 30284–30294, Jul. 2011.
- [37] L. K. Kim, U. Y. Choi, H. S. Cho, J. S. Lee, W. Lee, J. Kim, K. Jeong, J. Shim, J. Kim-Ha, and Y.-J. Kim, "Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in *Drosophila*.," *PLoS biology*, vol. 5, no. 9, p. e238, Sep. 2007.
- [38] C. R. Weston and R. J. Davis, "The JNK signal transduction pathway.," *Current opinion in cell biology*, vol. 19, no. 2, pp. 142–9, Apr. 2007.
- [39] J. Imler and J. A. Hoffmann, "Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*," *Molecular Cell*, pp. 23–28, 2000.
- [40] J. R. Delaney, S. Stöven, H. Uvell, K. V. Anderson, Y. Engström, and M. Mlodzik, "Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways.," *The EMBO journal*, vol. 25, no. 13, pp. 3068–77, Jul. 2006.

- [41] H. Wu, M. C. Wang, and D. Bohmann, "JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy.," *Mechanisms of development*, vol. 126, no. 8–9, pp. 624–37, 2009.
- [42] M. C. Wang, D. Bohmann, and H. Jasper, "JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*.,", *Developmental cell*, vol. 5, no. 5, pp. 811–6, Nov. 2003.
- [43] K.-S. Lee, K. Iijima-Ando, K. Iijima, W.-J. Lee, J. H. Lee, K. Yu, and D.-S. Lee, "JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span.,", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 43, pp. 29454–61, Oct. 2009.
- [44] J. Karpac, J. Hull-Thompson, M. Falleur, and H. Jasper, "JNK signaling in insulin-producing cells is required for adaptive responses to stress in *Drosophila*.,", *Aging cell*, vol. 8, no. 3, pp. 288–95, Jun. 2009.
- [45] J. Kallio, A. Leinonen, J. Ulvila, S. Valanne, R. A. Ezekowitz, and M. Rämetsä, "Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells.,", *Microbes and infection / Institut Pasteur*, vol. 7, no. 5–6, pp. 811–9, May 2005.
- [46] M. L. Circu and T. Y. Aw, "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.,", *Free radical biology & medicine*, vol. 48, no. 6, pp. 749–62, Mar. 2010.
- [47] D. A. Liebermann and B. Hoffman, "Gadd45 in stress signaling.,", *Journal of molecular signaling*, vol. 3, p. 15, Jan. 2008.
- [48] J. D. Evans, K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J.-L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou, and D. Hultmark, "Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*.,", *Insect molecular biology*, vol. 15, no. 5, pp. 645–56, Oct. 2006.
- [49] B. Biteau, J. Karpac, D. Hwangbo, and H. Jasper, "Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling.,", *Experimental gerontology*, vol. 46, no. 5, pp. 349–54, May 2011.
- [50] M. A. G. Essers, S. Weijzen, A. M. M. de Vries-Smits, I. Saarloos, N. D. de Ruiter, J. L. Bos, and B. M. T. Burgering, "FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK.,", *The EMBO journal*, vol. 23, no. 24, pp. 4802–12, Dec. 2004.
- [51] X. Wang, W. R. Chen, and D. Xing, "A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation.,", *Journal of cellular physiology*, no. May, pp. 1168–1178, May 2011.
- [52] D. G. McEwen and M. Peifer, "Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis.,", *Development*, vol. 132, no. 17, pp. 3935–46, Sep. 2005.
- [53] H. Agaisse and N. Perrimon, "The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses.,", *Immunological reviews*, vol. 198, pp. 72–82, Apr. 2004.
- [54] L. Wang and P. Ligoxygakis, "Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response.,", *Immunobiology*, vol. 211, no. 4, pp. 251–61, Jan. 2006.



- [55] V. M. Wright, K. L. Vogt, E. Smythe, and M. P. Zeidler, "Differential activities of the *Drosophila* JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3.," *Cellular signalling*, vol. 23, no. 5, pp. 920–7, May 2011.
- [56] N. I. Arbouzova and M. P. Zeidler, "JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions.," *Development*, vol. 133, no. 14, pp. 2605–16, Jul. 2006.
- [57] T. C. Neylan, "Hans Selye and the Field of Stress Research," vol. 10, no. 2, pp. 230–231, 1998.
- [58] A. V. Badyaev, "Role of Stress in Evolution: From Individual Adaptability to Evolutionary Adaptation," *Elsevier Inc*, chapter 13, pp. 277–302, 2005.
- [59] P. Storz, "Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress.," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 14, no. 4, pp. 593–605, Feb. 2011.
- [60] V. K. Becker, "Molekulare Maschinen und Alterung," *Spiegel der Forschung*, Jg./Nr. 1, pp. 42–47, Juni 2007.
- [61] J. S. Bus and J. E. Gibson, "Paraquat: Model for Oxidant-Initiated Toxicity," *Environmental Health Perspectives*, vol. 55, p. 37, Apr. 1984.
- [62] R. L. Auten and J. M. Davis, "The Role of Oxygen in Health and Disease - A Series of Reviews Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species The Devil Is in the Details," *Pediatric Research*, vol. 66, no. 2, pp. 121–127, 2009.
- [63] M. A. G. Essers, L. M. M. de Vries-Smits, N. Barker, P. E. Polderman, B. M. T. Burgering, and H. C. Korswagen, "Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling.," *Science*, vol. 308, no. 5725, pp. 1181–4, May 2005.
- [64] S. C. Manolagas and M. Almeida, "Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism.," *Molecular endocrinology*, vol. 21, no. 11, pp. 2605–14, Nov. 2007.
- [65] H. Wu, M. C. Wang, and D. Bohmann, "JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy," *Mechanisms of development*, vol. 126, no. 585, pp. 624–637, 2010.
- [66] G. P. Sykiotis and D. Bohmann, "Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*," *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, vol. 14, no. 1, pp. 76–85, 2009.
- [67] K. Taguchi, H. Motohashi, and M. Yamamoto, "Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution.," *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, vol. 16, no. 2, pp. 123–40, Feb. 2011.
- [68] K. B. Beckman and B. N. Ames, "The free radical theory of aging matures.," *Physiological reviews*, vol. 78, no. 2, pp. 547–81, Apr. 1998.



- [69] A. C. Maritim, R. A. Sanders, and J. B. Watkins, "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review.," *Journal of biochemical and molecular toxicology*, vol. 17, no. 1, pp. 24–38, Jan. 2003.
- [70] P. Kirkham and I. Rahman, "Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy.," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 111, no. 2, pp. 476–94, Aug. 2006.
- [71] D. B. Peden, "The role of oxidative stress and innate immunity in O(3) and endotoxin-induced human allergic airway disease.," *Immunological reviews*, vol. 242, no. 1, pp. 91–105, Jul. 2011.
- [72] N. McGinnis, E. Ragnhildstveit, A. Veraksa, and W. McGinnis, "A cap 'n' collar protein isoform contains a selective Hox repressor function.," *Development*, vol. 125, no. 22, pp. 4553–64, Nov. 1998.
- [73] J. Mohler, J. W. Mahaffey, E. Deutsch, and K. Vani, "Control of Drosophila head segment identity by the bZIP homeotic gene cnc.," *Development*, vol. 121, no. 1, pp. 237–47, Jan. 1995.
- [74] T. Verfaillie, M. Salazar, G. Velasco, and P. Agostinis, "Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy.," *International journal of cell biology*, vol. 2010, p. 930509, Jan. 2010.
- [75] H. Tian, B. Zhang, J. Di, G. Jiang, F. Chen, H. Li, L. Li, D. Pei, and J. Zheng, "Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK $\beta$  and Bcl-2/Bcl-xL.," *Cancer letters*, vol. 325, no. 1, pp. 26–34, Dec. 2012.
- [76] K. U. Tufekci, E. Civi Bayin, S. Genc, and K. Genc, "The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease.," *Parkinson's disease*, vol. 2011, p. 314082, Jan. 2011.
- [77] G. P. Sykiotis and D. Bohnamm, "Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease," *Sci Signal*, vol. 3, no. 112, pp. 1–45, 2010.
- [78] X. Wang, L. Tao, and C. X. Hai, "Redox-regulating role of insulin: the essence of insulin effect.," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 349, no. 2, pp. 111–27, Mar. 2012.
- [79] H. Jasper, "SKNy worms and long life.," *Cell*, vol. 132, no. 6, pp. 915–6, Mar. 2008.
- [80] J. S. Britton, W. K. Lockwood, L. Li, S. M. Cohen, and B. A. Edgar, "Drosophila's Insulin/PI3-Kinase Pathway Coordinates Cellular Metabolism with Nutritional Conditions," *Developmental Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 239–249, Feb. 2002.
- [81] R. S. Garofalo, "Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila.," *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 13, no. 4, pp. 156–62, 2002.
- [82] A. A. Teleman, "Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in Drosophila.," *The Biochemical journal*, vol. 425, no. 1, pp. 13–26, Jan. 2010.
- [83] N. Bashan, J. Kovsan, I. Kachko, H. Ovadia, and A. Rudich, "Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species," *Physiol. Review*, no. 89, pp. 27–71, 2009.

- [84] J. L. Rains and S. K. Jain, "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes.," *Free radical biology & medicine*, vol. 50, no. 5, pp. 567–75, Mar. 2011.
- [85] W. Brogiolo, H. Stocker, T. Ikeya, F. Rintelen, R. Fernandez, and E. Hafen, "An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control.," *Current biology: CB*, vol. 11, no. 4, pp. 213–21, Mar. 2001.
- [86] B. Fuss, T. Becker, I. Zinke, and M. Hoch, "The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in Drosophila.," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 945–8, Dec. 2006.
- [87] M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, and M. Famulok, "Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance.," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 941–4, Dec. 2006.
- [88] M. E. Giannakou and L. Partridge, "Role of insulin-like signalling in Drosophila lifespan.," *Trends in biochemical sciences*, vol. 32, no. 4, pp. 180–8, Apr. 2007.
- [89] S. Hannenhalli and K. H. Kaestner, "The evolution of Fox genes and their role in development and disease.," *Nature reviews. Genetics*, vol. 10, no. 4, pp. 233–40, Apr. 2009.
- [90] O. Puig and R. Tjian, "Nutrient Availability and Growth: Regulation of Insulin Signaling by dFOXO/FOXO1," *Cell Cycle*, no. 5, pp. 503–505, March 2006.
- [91] H. Daitoku and A. Fukamizu, "FOXO transcription factors in the regulatory networks of longevity.," *Journal of biochemistry*, vol. 141, no. 6, pp. 769–74, Jun. 2007.
- [92] D. Weigel and H. Jäckle, "The fork head Domain: A novel DNA Binding Motif of Eucaryotic Transcription Factors?," *Cell*, vol. 63, pp. 455–456, Nov. 1990.
- [93] K. H. Kaestner, W. Knöchel, and D. E. Martínez, "Unified nomenclature for the winged helix / forkhead transcription factors," *Genes and Development*, no. 14, pp. 142–146, 2000.
- [94] M. E. Carter, "Quick guide FOXO transcription factors," *Current Biology*, vol. 17, no. 4, pp. 113–114.
- [95] E. W.-F. Lam, R. E. Francis, and M. Petkovic, "FOXO transcription factors: key regulators of cell fate.," *Biochemical Society transactions*, vol. 34, no. Pt 5, pp. 722–6, Nov. 2006.
- [96] F. M. J. Jacobs, L. P. van der Heide, P. J. E. C. Wijchers, J. P. H. Burbach, M. F. M. Hoekman, and M. P. Smidt, "FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 38, pp. 35959–67, Sep. 2003.
- [97] A. Eckers, "Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Umwelttoxene Einfluss von Metallionen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen," 2009.
- [98] C. Bouchard, J. Marquardt, A. Brás, R. H. Medema, and M. Eilers, "Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins.," *The EMBO journal*, vol. 23, no. 14, pp. 2830–40, Jul. 2004.

- [99] S. Ramaswamy, N. Nakamura, I. Sansal, L. Bergeron, and W. R. Sellers, "A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR.," *Cancer cell*, vol. 2, no. 1, pp. 81–91, Jul. 2002.
- [100] M. K. Lehtinen, Z. Yuan, P. R. Boag, Y. Yang, J. Villén, E. B. E. Becker, S. DiBacco, N. de la Iglesia, S. Gygi, T. K. Blackwell, and A. Bonni, "A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span.," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 987–1001, Jun. 2006.
- [101] J. M. Kramer, J. T. Davidge, J. M. Lockyer, and B. E. Staveley, "Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation.," *BMC developmental biology*, vol. 3, p. 5, Jul. 2003.
- [102] T. Becker, G. Loch, M. Beyer, I. Zinke, A. C. Aschenbrenner, P. Carrera, T. Inhester, J. L. Schultze, and M. Hoch, "FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis.," *Nature*, vol. 463, no. 7279, pp. 369–73, Jan. 2010.
- [103] K. U. Birkenkamp and P. J. Coffey, "FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for?," *Journal of immunology*, vol. 171, no. 4, pp. 1623–9, Aug. 2003.
- [104] E. L. Greer and A. Brunet, "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.," *Oncogene*, vol. 24, no. 50, pp. 7410–25, Nov. 2005.
- [105] J.-W. Hwang, S. Rajendrasozhan, H. Yao, S. Chung, I. K. Sundar, H. L. Huyck, G. S. Pryhuber, V. L. Kinnula, and I. Rahman, "FOXO3 Deficiency Leads to Increased Susceptibility to Cigarette Smoke-Induced Inflammation, Airspace Enlargement, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease.," *Journal of immunology*, vol. 187, no. 2, pp. 987–98, Jul. 2011.
- [106] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, and W. P. Parks, "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 51, no. 5, pp. 1417–1423, 1973.
- [107] O. Shimomura, "The discovery of aequorin and green fluorescent protein.," *Journal of microscopy*, vol. 217, no. Pt 1, pp. 1–15, Jan. 2005.
- [108] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," *American Association for the Advancement of Science*, vol. 263, no. 5148, pp. 802–805, 2008.
- [109] M. A. Jünger, F. Rintelen, H. Stocker, J. D. Wasserman, M. Végh, T. Radimerski, M. E. Greenberg, and E. Hafen, "The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling.," *Journal of biology*, vol. 2, no. 3, p. 20, Jan. 2003.
- [110] Y. Honda and S. Honda, "The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*.," *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 13, no. 11, pp. 1385–93, Aug. 1999.

- [111] D. Bridge, A. G. Theofilis, R. L. Holler, E. Marcinkevicius, R. E. Steele, and D. E. Martínez, "FoxO and stress responses in the cnidarian *Hydra vulgaris*," *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11686, Jan. 2010.
- [112] J. Dundjerski, "Cellular stress response: Defence against metal toxicity," *Jugoslovenska medicinska biohemija*, vol. 23, no. 1. pp. 1–9, 2004.
- [113] B. Lant and K. B. Storey, "An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system.," *International journal of biological sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 9–50, Jan. 2010.
- [114] T. Tanji, E.-Y. Yun, and Y. T. Ip, "Heterodimers of NF-kappaB transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 33, pp. 14715–20, Aug. 2010.
- [115] Y.-H. Liu, J. S. Jakobsen, G. Valentin, I. Amarantos, D. T. Gilmour, and E. E. M. Furlong, "A systematic analysis of Tinman function reveals Eya and JAK-STAT signaling as essential regulators of muscle development.," *Developmental cell*, vol. 16, no. 2, pp. 280–91, Feb. 2009.
- [116] J. R. Friedman and K. H. Kaestner, "The Foxa family of transcription factors in development and metabolism.," *Cellular and molecular life sciences CMLS*, vol. 63, no. 19–20, pp. 2317–28, Oct. 2006.
- [117] P. Carlsson, "Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism," *Developmental Biology*, vol. 250, no. 1, pp. 1–23, Oct. 2002.
- [118] M. B. Sokolowski, "Drosophila Larval Foraging Behavior," *Animal Behav.*, no. 30, pp. 1252–1261, 1982.
- [119] A. Vermehren-Schmaedick, J. A. Ainsley, W. A. Johnson, S.-A. Davies, and D. B. Morton, "Behavioral responses to hypoxia in *Drosophila* larvae are mediated by atypical soluble guanylyl cyclases.," *Genetics*, vol. 186, no. 1, pp. 183–96, Sep. 2010.
- [120] J. Schottenfeld, Y. Song, and A. S. Ghabrial, "Tube continued: morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system.," *Current opinion in cell biology*, vol. 22, no. 5, pp. 633–9, Oct. 2010.
- [121] T. B. Dansen and B. M. T. Burgering, "Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins.," *Trends in cell biology*, vol. 18, no. 9, pp. 421–9, Sep. 2008.
- [122] C. Cela and M. Llimargas, "Egfr is essential for maintaining epithelial integrity during tracheal remodelling in *Drosophila*," *Development*, vol. 133, no. 16, pp. 3115–25, Aug. 2006.
- [123] Y. Furukawa-Hibi, K. Yoshida-Araki, T. Ohta, K. Ikeda, and N. Motoyama, "FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 30, pp. 26729–32, Jul. 2002.
- [124] J. L. Bos, "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress," *Nature*, vol. 419, pp. 316–321, September 2002.

- [125] W. Ouyang and M. O. Li, "Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance.," *Trends in immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 26–33, Jan. 2011.
- [126] M. Wang, X. Zhang, H. Zhao, Q. Wang, and Y. Pan, "FoxO gene family evolution in vertebrates.," *BMC evolutionary biology*, vol. 9, p. 222, Jan. 2009.
- [127] A. Brunet, L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H.-L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. a Sinclair, F. W. Alt, and M. E. Greenberg, "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase.," *Science*, vol. 303, no. 5666, pp. 2011–5, Mar. 2004.
- [128] A. van der Horst and B. M. T. Burgering, "Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 8, no. 6, pp. 440–50, Jun. 2007.
- [129] C. Slack, M. E. Giannakou, A. Foley, M. Goss, and L. Partridge, "dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*.," *Aging cell*, no. March, pp. 1–16, Mar. 2011.
- [130] V. Leclerc and J.-M. Reichhart, "The immune response of *Drosophila melanogaster*.," *Immunological reviews*, vol. 198, pp. 59–71, Apr. 2004.
- [131] C. Fink, "Die Architektur des intestinalen Immunsystems der Taufliege *Drosophila melanogaster*," 2012.
- [132] H. Tran, A. Brunet, J. M. Grenier, S. R. Datta, A. J. Fornace, P. S. DiStefano, L. W. Chiang, and M. E. Greenberg, "DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein.," *Science*, vol. 296, no. 5567, pp. 530–4, Apr. 2002.
- [133] H. W. Zhao, D. Zhou, and G. G. Haddad, "Anti-microbial peptides increase tolerance to oxidant stress in *Drosophila melanogaster*.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 8, pp. 6211–6218, Dec. 2010.
- [134] H. W. Zhao, D. Zhou, V. Nizet, and G. G. Haddad, "Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely high O<sub>2</sub> environments.," *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11701, Jan. 2010.
- [135] S. Uttenweiler-Joseph, M. Moniatte, M. Lagueux, A. Van Dorsselaer, J. A. Hoffmann, and P. Bulet, "Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 19, pp. 11342–7, Sep. 1998.
- [136] K. Ishii, H. Hamamoto, K. Imamura, T. Adachi, M. Shoji, K. Nakayama, and K. Sekimizu, "Porphyromonas gingivalis peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 43, pp. 33338–47, Oct. 2010.
- [137] M. G. Moule, D. M. Monack, and D. S. Schneider, "Reciprocal Analysis of Francisella novicida Infections of a *Drosophila melanogaster* Model Reveal Host-Pathogen Conflicts Mediated by Reactive Oxygen and imd-Regulated Innate Immune Response," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 8, p. e1001065, Aug. 2010.



- [138] G. A. Silverman, J. C. Whisstock, S. P. Bottomley, J. a Huntington, D. Kaiserman, C. J. Luke, S. C. Pak, J.-M. Reichhart, and P. I. Bird, "Serpins Flex Their Muscle: 1. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 32, pp. 24299–305, Aug. 2010.
- [139] M. D. Nielsen, X. Luo, B. Biteau, K. Syverson, and H. Jasper, "14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*.,", *Aging cell*, vol. 7, no. 5, pp. 688–99, Oct. 2008.
- [140] Z. E. Suntres, "Role of antioxidants in paraquat toxicity.," *Toxicology*, vol. 180, no. 1, pp. 65–77, Oct. 2002.
- [141] A. Berdichevsky, L. Guarente, and A. Bose, "Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 28, pp. 21581–9, Jul. 2010.
- [142] R. J. Davis, "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 239–52, Oct. 2000.
- [143] A. R. Simon, U. Rai, B. L. Fanburg, and B. H. Cochran, "Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species," 2012.
- [144] S. Brun et al., "The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*.,", *Genes to cells devoted to molecular & cellular mechanisms*, vol. 11, no. 4, pp. 397–407, Apr. 2006.
- [145] N. R. Madamanchi, S. Li, C. Patterson, and M. S. Runge, "Reactive Oxygen Species Regulate Heat-Shock Protein 70 via the JAK/STAT Pathway," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 21, no. 3, pp. 321–326, Mar. 2001.
- [146] C. Y. Logan and R. Nusse, "The Wnt signaling pathway in development and disease.," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 20, pp. 781–810, Jan. 2004.
- [147] D. Hoogeboom, M. A. G. Essers, P. E. Polderman, E. Voets, L. M. M. Smits, and B. M. T. Burgering, "Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 14, pp. 9224–30, Apr. 2008.
- [148] B. Ponugoti, G. Dong, and D. T. Graves, "Role of forkhead transcription factors in diabetes-induced oxidative stress.," *Experimental diabetes research*, vol. 2012, p. 939751, Jan. 2012.
- [149] D. Ferrandon, A. C. Jung, M. Criqui, B. Lemaitre, S. Uttenweiler-Joseph, L. Michaut, J. Reichhart, and J. A. Hoffmann, "A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway.," *The EMBO journal*, vol. 17, no. 5, pp. 1217–27, Aug. 1998.
- [150] D. Das, R. Aradhya, D. Ashoka, and M. Inamdar, "Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development.," *Cell and tissue research*, vol. 331, no. 2, pp. 565–70, Feb. 2008.

- [151] D. Das, D. Ashoka, R. Aradhya, and M. Inamdar, "Gene expression analysis in post-embryonic pericardial cells of *Drosophila*.,” *Gene expression patterns: GEP* , vol. 8, no. 3, pp. 199–205, Feb. 2008.
- [152] E. A. Bach, L. A. Ekas, A. Ayala-Camargo, et al. "GFP reporters detect the activation of *Drosophila* JAK/STAT pathway *in vivo*.,” *Gene Expression Patterns*, vol. 7, pp. 323-331, 2007.
- [153] J. Peak, J. Y. Lo, S. D. Narasimhan, et al. "Mitochondrial SKN-1/Nrf Mediates a Conserved Starvation Response.,” *Cell metabolism*, vol. 16, pp. 526-537, Oct. 2012.



## 7 Zusammenfassung

FoxO-Proteine gehören zur umfangreichen Familie der Forkhead Box-Transkriptionsfaktoren. Den vier FoxO-Proteinen des Menschen, die als FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6 bezeichnet werden, steht in der Taufliege *Drosophila melanogaster* ein einziges Homolog gegenüber. Bei den FoxO-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um eine evolutionär sehr alte und hochkonservierte Gruppe von Proteinen. Ihnen gemein ist eine zentrale Rolle, die sie in der Regulation metabolischer Prozesse der Zelle einnehmen. Sie werden durch die aktivierte Insulin/IGF-Signalkaskade inhibiert und kontrollieren unterschiedliche zelluläre Eigenschaften. Insbesondere sind sie bei der Inhibition des Zellzyklus, der Antwort auf oxidativen Stress, bei der Apoptose und in verschiedenen Aspekten des Metabolismus von elementarer Bedeutung. In *Drosophila* wurde auch eine Beteiligung von FoxO an Reaktionen des angeborenen Immunsystems gezeigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte FoxO als zentraler Vermittler der zellulären Antwort auf Stress identifiziert werden, der unspezifisch durch eine heterogene Auswahl von Stressoren aktiviert wird. Dabei handelt es sich um einen evolutionär hochkonservierten Prozess, der in respiratorischen Epithelien der Taufliege und des Menschen gleichermaßen zu funktionieren scheint.

FoxO konnte aber nicht nur als Schlüsselmolekül der Reaktion auf Umweltstressoren in Barriereepithelien identifiziert werden, sondern auch als Vermittler einer durch Stress induzierten Immunreaktion. Der zentrale Verteidigungsmechanismus gegen eindringende Mikroorganismen in *Drosophila* ist die Synthese Antimikrobieller Peptide (AMPs). Ihre Expression wird durch zwei intrazelluläre Signalkaskaden (den Toll- und den IMD-Signalweg) vermittelt durch NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren, reguliert. Eine Aktivierung dieser elementaren Immunreaktion kann aber auch in Abwesenheit einer Infektion und unabhängig von den NF- $\kappa$ B-Faktoren, durch Stress unter der Beteiligung des Transkriptionsfaktors FoxO induziert werden. Zwei Stressoren, die eine derartige Immunantwort auslösen können, wurden in dieser Arbeit identifiziert; es handelt sich um metabolischen und oxidativen Stress. Diese beiden Stressoren rufen jedoch gegensätzliche Funktionen des FoxO-Proteins hervor. Während metabolischer Stress in Form von Nahrungsentzug eine direkte FoxO-induzierte AMP-Expression initiiert, erfährt die durch oxidativen Stress hervorgerufene AMP-Expression eine negative Regulation durch FoxO.

Die Entdeckung eines bislang unbekannten, NF- $\kappa$ B-Signalweg-unabhängigen Regulators des angeborenen Immunsystems, eröffnet neue Perspektiven der Immunregulation und präsentiert mit FoxO ein Bindeglied zwischen zellulärem Stress und dem angeborenen

Immunsystem. Damit wurde ein Mechanismus entdeckt, der eine Anpassung der Immunabwehr an wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht.

## 8 Summary

FoxO proteins are members of a large family of forkhead box transcription factors. The four human FoxOs, referred to as FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 and FoxO6, are faced by a single homolog in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and represent a group of evolutionary ancient and highly conserved proteins. A central function of FoxO transcription factors is the regulation of metabolic processes within the cell, thus, they are inhibited by Insulin/IGF pathway activity. In addition, these factors control various cellular mechanisms, such as cellcycle inhibition, oxidative stress response, and apoptosis. In *Drosophila* FoxO seems also to be involved in innate immune reactions.

This work identified FoxO as a central mediator of cellular responses to stress, which is generally activated by heterogeneous stress conditions. This newly-characterized function is an evolutionary highly conserved process, which seems to operate in respiratory epithelial cells of *Drosophila* and human likewise.

However, FoxO was not only identified as a key molecule in the response to environmental stressors in barrier epithelia, but also as a mediator of a stress-induced immune reaction.

In *Drosophila*, the main defense reaction against invading microorganisms is the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs). Usually, the AMP gene expression is regulated by two intracellular signaling pathways - the Toll- and the IMD-pathway, mediated by NF- $\kappa$ B transcription factors. Here, I demonstrate that an activation of this basic immune reaction can also be induced in an infection- and NF- $\kappa$ B-independent manner, namely by stress with the participation of FoxO. As part of this work two stress factors, metabolic and oxidative stress, were identified that are able to induce an immune response. Interestingly, FoxO is involved differentially in the reaction to these two stress conditions. Whereas metabolic stress, induced by starvation, results in an AMP expression dependent on FoxO, this transcription factor negatively regulates oxidative stress-induced AMP expression. The characterization of an innovative innate immune regulation process by FoxO, which works independently of the canonical NF- $\kappa$ B signaling cascades, offers new perspectives in immune regulation and presents a connection between cellular stress and innate immunity. This mechanism allows a direct adjustment of the immune reaction to alternating environmental conditions.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für das Überlassen des Themas, die Förderung und stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Danke für die stets positive Einstellung meiner Arbeit gegenüber.

Desgleichen möchte ich Herrn PD Dr. Holger Heine für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Zurverfügungstellung der Labor- und Arbeitsräume danken. Danke auch für die zahlreichen Ratschläge und die unermüdliche Gesprächsbereitschaft und Unterstützung in der Umsetzung dieser Arbeit.

Dr. Thomas Scholzen möchte ich für die geduldige Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie, die stets offene Tür bei Fragen und Problemen und die vielen kreativen Ideen danken.

Der Arbeitsgruppe „Angeborene Immunität“ (Ina Goroncy, Suhad Al-Badri, Katrin Böhnstedt, Celia Chang, Tanja Mengden, Kim Kallsen, Anna Störmer, Erwin Duitman, Corinna Bang, Karina Stein und Jochen Ulmer) danke ich nicht nur für die Unterstützung, die so manchen Abschnitt auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit ungemein erleichtert hat, sondern auch für die schöne Zeit mit euch. Dr. Christina Wagner möchte ich für die interessanten Dialoge und die Hilfsbereitschaft danken.

Des Weiteren danke ich der Kieler Arbeitsgruppe „Zoophysiologie II“ für die Unterstützung im Umgang mit Fliegen und bei der Lösung zahlreicher Probleme.

# 10 Curriculum Vitae

Name: Karin Agnes Uliczka  
 Geburtsdatum: 13. Mai 1980  
 Geburtsort: Neustadt (Prudnik), Polen  
 Nationalität: deutsch

---

## Schulausbildung

---

1987-1994: Grundschule Pogòrze and Hermann-Löns-Schule, Uelzen  
 1994-2001: Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen

Juni 2001: -Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

---

## Studium, Diplom- und Doktorarbeit

---

2002-2006: Grundstudium der Biologie an der  
 Georg-August Universität Göttingen und der Universität Hamburg  
 2006-2008: Hauptstudium der Biologie an der Universität Hamburg  
 (Hauptfächer: Zoologie, Genetik und Molekularbiologie, Zusatzfach:  
 Mikrobiologie)

2008-2009: Anfertigung der Diplomarbeit im Hauptfach Zoologie am  
 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg  
 bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Februar 2009 -akademischer Abschluss: Diplom-Biologin

seit Juli 2009: Anfertigung der Doktorarbeit am Forschungszentrum Borstel,  
 Leibniz Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Borstel  
 bei Prof. Dr. Thomas Roeder

- Publikationen: Warmbold C\*, **Uliczka K**\*, Rus F, Suck R, Petersen A, Silverman N, Ulmer AJ, Heine H, Roeder T (2012) Der p 1 activates the innate immune response of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Immunol*, 190: 1-6. (\*shared first authorship)
- Bachmann A, Petter M, Tilly A, Biller L, **Uliczka K**, Duffy M, Tannich E, Bruchhaus I (2012) Temporal Expression and Localization Patterns of Variant Surface Antigens in Clinical *Plasmodium falciparum* Isolates during Erythrocyte Schizogony. *PLOS one*, 7/11: 1-15.
- Roeder T, Isermann K, Kallsen K, **Uliczka K**, Wagner C (2012) A *Drosophila* asthma model - what the fly tells us about inflammatory diseases of the lung. *Adv Exp Med Biol*. 710: 37-47.
- Roeder T, Kallsen K, **Uliczka K** (2011) *Drosophila* als Modell in der Asthma-Forschung. *BIOspektrum* 03.11, 302-305.

# 11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Charakterisierung des Transkriptionsfaktors FoxO als zentraler Stressmediator und Effektor einer stressinduzierten Immunantwort im respiratorischen Epithel der Taufliege *Drosophila melanogaster*“ unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt zu haben. Die Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, 14. Dezember 2012

---

Karin Uliczka